

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de metalofármacos: novos complexos
de ruténio contendo ligandos macromoleculares como
agentes antitumorais**

Maria Inês Genro Pereira

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Isabel Tomaz e Doutora Andreia Valente

[2016]

Agradecimentos

Estou finalmente a chegar ao final do meu percurso académico, mas antes de olhar para a frente e encarar os desafios que me esperam, há que olhar para trás e refletir um pouco no caminho percorrido, e nas pessoas que me acompanharam e me apoiaram ao longo de todos estes anos, e em particular que me apoiaram nesta última etapa desafiante do mestrado.

Assim, gostaria primeiramente de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Ana Isabel Tomaz e Doutora Andreia Valente, por me guiarem ao longo deste projeto, com o qual sinto que aprendi bastante. Chegando ao fim do projeto sinto-me afortunada por ter tido orientadoras que demonstram tanta amizade pelos seus estudantes, e que me guiaram ao longo deste ano com tanta paciência e dedicação.

À Professora Doutora Maria Helena Garcia, por me aceitar neste grupo de trabalho, e também pela amizade e dedicação demonstradas. As palavras certas ditas na altura certa fazem toda a diferença para um aluno que atravessa esta etapa, que é uma das mais desafiantes da sua vida.

Ao Doutor Rodrigo de Almeida e ao Doutor Hugo Filipe pelo apoio e disponibilidade ao longo dos ensaios de fluorescência.

À Doutora Paula Robalo e Oscar Rojas por toda a simpatia, disponibilidade e apoio prestados no decorrer dos estudos de voltametria cíclica.

À Doutora Catarina Roma-Rodrigues e à Professora Doutora Alexandra Fernandes pela disponibilidade em realizar os ensaios de citotoxicidade.

À Professora Doutora Maria José Brito pela amabilidade e apoio prestado.

Aos meus colegas de laboratório, Leonor, Tânia, Sofia, Anabela, Bebian, David, Adhan, Francisco e Maciej pela sua amizade, boa disposição, dinamismo e pela sempre presente disponibilidade para a entreatajuda.

Aos meus amigos, Nuno P., João P., Duarte C., Natacha A., Soraia B., Joel C., Catarina M., Lydia N., Ana C., e muitos outros que apesar de não serem mencionados, estão longe de estarem esquecidos. Recentes ou de longa data, todos lá estiveram para partilharem os bons momentos e me ajudarem a superar os piores.

Aos meus familiares, que sempre me deixaram seguir os meus sonhos, e sempre fizeram todo o possível para me ajudar a concretizá-los. Devo-lhes este mestrado mais que a qualquer outra pessoa, e por isso a eles o dedico.

Um simples agradecimento não faz justiça ao impacto que muitos de vós tiveram, e alguns continuarão a ter na minha vida. Conhecer-vos tornou-me uma pessoa melhor.

A todos, muito obrigada!

Resumo

O cancro é uma das maiores causas de morte a nível mundial, podendo ser causado por fatores internos, como a herança genética de cada indivíduo, ou exteriores, como a exposição a substâncias ou radiação perigosas. Os tratamentos mais comuns são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo esta última a mais importante no contexto deste trabalho.

Ainda que os metalofármacos que atualmente se encontram em uso clínico apresentem boa atividade anticancerígena para alguns tipos de tumores, a terapia é também acompanhada por vários efeitos secundários muito debilitantes, sendo por isso necessário uma contínua investigação nesta área. Vários grupos de investigação se dedicam à descoberta e desenvolvimento de novos complexos metálicos para o tratamento do cancro e das suas metástases, tendo os compostos de ruténio demonstrado excelente potencial para esta aplicação.

No âmbito desta tese de mestrado foram sintetizados três complexos de ruténio (II), dois deles novos, com a fórmula geral $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-R})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, na qual bpy-R é a 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina ou se refere a uma bipiridina funcionalizada com polilactídeo ou com polilactídeo funcionalizado com glucose. Estes complexos foram caracterizados através das técnicas de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC), espectroscopia de UV-Vis, FTIR, espectroscopia de emissão (fluorescência/fosforescência) e voltametria cíclica. Quando adequado, a sua pureza foi avaliada através de análise elementar. Estudou-se a estabilidade dos compostos por espectroscopia eletrónica nos solventes DMSO, DMSO/HEPES e DMSO/DMEM ao longo de 24 horas. Verificou-se que todos apresentaram estabilidade adequada (entre 86,0% e 97,7% de complexo intacto) para prosseguirem para a fase de ensaios biológicos.

Foram efetuados estudos de interação dos complexos com albumina sérica humana (HSA), que é a mais abundante no sangue humano, tendo-se concluído que os novos complexos sintetizados interactivam com esta proteína transportadora.

A citotoxicidade dos complexos foi avaliada por testes *in vitro* nas linhas celulares humanas A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, sensível à cisplatina), MCF7 (adenocarcinoma da mama hormono-dependente) e fibroblastos (células não-tumorigénicas), com um tempo de incubação de 48 horas. Os complexos contendo polímero mostraram ser pouco citotóxicos, com valores de IC_{50} superiores a 100 μM em todas as linhas celulares estudadas. O complexo sem polímero teve também valores de IC_{50} elevados para as linhas MCF7 ($> 100 \mu\text{M}$) e fibroblastos (93,3 μM), no entanto mostrou ser bastante citotóxico na linha A2780 ($\text{IC}_{50} = 0,56 \mu\text{M}$).

Os resultados obtidos suportam o potencial dos compostos preparados neste trabalho como possíveis metalofármacos para o tratamento de tumores, e tornam de grande interesse a continuação do estudo dos mesmos.

Palavras-chave: Cancro, complexos de Ru(II), estabilidade, fluorescência, citotoxicidade.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and it can be caused by internal factors, such as genetic inheritance, or by external factors, like exposition to harmful substances or radiation. The most common treatments are surgery, radiotherapy and chemotherapy, the last one being the most important in the context of this work. Even if the current metallodrugs in clinical use show a good anticancer activity towards some cancer cell lines, the treatment is usually accompanied by several debilitating secondary effects. Thus, the continuous research in this field is mandatory. For decades, several investigation groups have dedicated their efforts to the discovery and development of new metallic complexes for the treatment of cancer and metastasis.

In the scope of this Master Thesis three ruthenium complexes were synthesized, two of them new, with the general formula $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-R})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, where bpy-R is 4,4'-bis(hydroxymethyl)-2,2'-bipyridine or refers to a bipyridine functionalized with polylactide or polylactide functionalized with glucose. These complexes were characterized by NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC), electronic spectroscopy, FTIR, cyclic voltammetry and fluorescence. When applicable, the purity was evaluated through elemental analysis.

The compounds evaluated on their stability by electronic spectroscopy using DMSO, DMSO/HEPES and DMSO/DMEM as solvents, over 24 hours. All of them displayed an adequate stability (between 86,0% e 97,7% of intact compound) to proceed to biological testing phase.

Interactions studies between the complexes and human serum albumin (HSA), the most abundant carrier protein in human blood were performed using emission spectroscopy which indicated that the new complexes are able to bind to HSA is.

The cytotoxicity of the complexes was evaluated in *in vitro* using the human cell lines A2780 (human ovary adenocarcinoma, sensitive to cisplatin), MCF7 (breast adenocarcinoma, hormone dependent), and fibroblasts (healthy cells), with an incubation time of 48 hours. Complexes containing polymer showed little cytotoxicity, with IC_{50} values superior to 100 μM in all the cell lines. The complex that does not contain polymer also had high IC_{50} values for MCF7 line ($> 100 \mu\text{M}$) and fibroblasts (93,3 μM), however it showed good cytotoxicity in A2780 line ($\text{IC}_{50} = 0,56 \text{ M}$).

The obtained results support the potential of the compounds prepared in this work as possible metallodrugs for tumor treatment, and is it of great interest to continue their study.

Keywords: Cancer, Ru(II) complexes, stability, fluorescence, cytotoxicity.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Ligandos e complexos	xiv
Símbolos e Abreviaturas	xv
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. O cancro	1
1.2. Metalofármacos e a sua aplicação em quimioterapia	2
1.2.1 Cisplatina e derivados	2
1.2.2. Complexos de ruténio	3
1.2.3. NAMI-A e KP1019: pioneiros dos metalofármacos de ruténio	4
1.2.4. Compostos de ruténio organometálicos e de coordenação.....	6
1.3. Enquadramento do trabalho	11
Capítulo 2 - Síntese e caracterização dos macroligandos	13
2.1. Síntese dos macroligandos Bpy-PLA e Bpy-PLA-Gluc	13
2.1.1. Síntese do macroligando Bpy-PLA.....	13
2.1.2. Síntese do macroligando Bpy-PLA-Gluc.....	14
2.2. Caracterização dos macroligandos por RMN.....	15
Capítulo 3 - Síntese e caracterização dos complexos de Ruténio (II)	19
3.1. Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$	19
3.2. Caracterização dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$	20
3.2.1. Caracterização por RMN.....	20

3.2.2. Caracterização por UV-Vis	28
3.2.3. Caracterização por FTIR	29
3.2.4. Caracterização por Espectroscopia de Emissão (fluorescência/fosforescência)	31
3.2.5. Caracterização por Voltametria Cíclica	33
Capítulo 4 - Estudos <i>in vitro</i>	38
4.1. Estabilidade em solução	38
4.2. Estudo <i>in vitro</i> com moléculas de interesse biológico: interação com a albumina humana	42
4.3. Atividade <i>in vitro</i> em células tumorais humanas: ensaios de viabilidade celular	49
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	52
5.1. Solventes e reagentes	52
5.2. Instrumentação e técnicas de caracterização e análise	54
5.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	54
5.2.2. Espectroscopia Eletrônica	54
5.2.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	55
5.2.4. Espectroscopia de Emissão (Fluorescência/Fosforescência)	55
5.2.5. Voltametria Cíclica	60
5.2.6. Análise Elementar	60
5.3. Métodos experimentais de síntese.....	60
5.3.1. Síntese do precursor <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ Cl ₂]	60
5.3.2. Síntese do macroligando Bpy-PLA.....	61
5.3.3. Síntese do macroligando Bpy-PLA-Gluc.....	62
5.3.4. Síntese do complexo F01: [Ru(bpy) ₂ (bpy-PLA)][CF ₃ SO ₃] ₂	62
5.3.5. Síntese do complexo F02: [Ru(bpy) ₂ (bpy-PLA-Gluc)][CF ₃ SO ₃] ₂	63
5.3.6. Síntese do complexo F03: [Ru(bpy) ₂ {bpy(CH ₂ OH) ₂ }][CF ₃ SO ₃] ₂	64
Capítulo 6 - Conclusões e perspectivas futuras	66
Bibliografia	69
Anexos	79

Índice de Figuras

FIGURA 1.1: ESTRUTURAS DA CISPLATINA, CARBOPLATINA E OXALIPLATINA, POR ESSA ORDEM.....	2
FIGURA 1.2: ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS NAMI-A À ESQUERDA E KP1019 À DIREITA. ADAPTADO DE BERGAMO ET. AL. 2012. [9].....	5
FIGURA 1.3: ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS RAPTA-T À ESQUERDA, RM175 À DIREITA. ADAPTADO DE BERGAMO ET. AL., 2012. [9].....	6
FIGURA 1.4: ESQUEMA DO CICLO CELULAR. [27]	7
FIGURA 1.5: ESTRUTURAS DE COMPLEXOS DE Ru(II): A) ESTRUTURA GERAL; B) ESTRUTURA DO COMPLEXO DESIGNADO POR TM34; C) ESTRUTURA DO COMPLEXO RuPMC. [5], [24], [28].....	8
FIGURA 2.1: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO MACROLIGANDO BPY-PLA.	13
FIGURA 2.2: MECANISMO GENÉRICO DA ABERTURA DO CICLO DO D,L-LACTÍDEO USANDO UM NUCLEÓFILO COMO CATALISADOR E UM ÁLCOOL PRIMÁRIO COMO INICIADOR DA POLIMERIZAÇÃO [46].	14
FIGURA 2.3: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO MACROLIGANDO BPY-PLA-GLUC.	14
FIGURA 2.4: ESTRUTURA DO LIGANDO BPY-PLA, DE BIPYRIDINA COM DUAS CADEIAS POLIMÉRICAS DE POLILACTÍDEO, COM AS NUMERAÇÕES ATRIBUÍDAS AOS PROTÕES PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO NOS ESPETROS DE RMN.....	15
FIGURA 2.5: ESPETRO DE ¹ H-RMN DO LIGANDO BPY-PLA, EM ACETONITRILÓ-D ₃ . OS SINAIS ASSINALADOS COM * FORAM ATRIBUÍDOS A SOLVENTES: 5,45 PPM (DICLOROMETANO); 3,42 PPM (ÉTER DIETÍLICO); 3,27 PPM (METANOL); 1,94 PPM (ACETONITRILÓ). [47]	16
FIGURA 2.6: ESTRUTURA DO LIGANDO BPY-PLA-GLUC, DE BIPYRIDINA COM DUAS CADEIAS POLIMÉRICAS DE POLILACTÍDEO, COM AS NUMERAÇÕES ATRIBUÍDAS AOS PROTÕES PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO NOS ESPETROS DE RMN.....	17
FIGURA 2.7: ESPETRO DE ¹ H-RMN DO LIGANDO BPY-PLA-GLUC, EM CLOROFÓRMIO-D. OS SINAIS ASSINALADOS COM * FORAM ATRIBUÍDOS A SOLVENTES: 7,26 PPM (CDCl ₃); 3,75 PPM (THF); 3,49 PPM (ÉTER DIETÍLICO); 1,56 PPM (H ₂ O); 1,21 PPM (ÉTER DIETÍLICO); 1,25 E 0,88 PPM (GREASE). [47]	18
FIGURA 3.1: ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS F01, F02 E F03.	19
FIGURA 3.2: COMPLEXO [Ru(BPY) ₂ {BPY(CH ₂ OH) ₂ }] [CF ₃ SO ₃] ₂ , TAMBÉM DENOMINADO POR F03, COM AS NUMERAÇÕES ATRIBUÍDAS AOS PROTÕES PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO NOS ESPETROS DE RMN.....	20
FIGURA 3.3: ESPETRO DE ¹ H-RMN DO COMPLEXO F03, [Ru(BPY) ₂ (BPY(CH ₂ OH) ₂)] [CF ₃ SO ₃] ₂ , EM DMSO-D ₆	21
FIGURA 3.4: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPETROS DE ¹ H-RMN DO COMPLEXO F03 E DO LIGANDO BPY(CH ₂ OH) ₂ , EM DMSO-D ₆	22

FIGURA 3.5: COMPLEXO F03, $[\text{Ru}(\text{BPY})_2\{\text{BPY}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.	22
FIGURA 3.6: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPETROS DE PROTÃO DO COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{BPY})_2\text{Cl}_2]$ COM O COMPLEXO F03 $[\text{Ru}(\text{BPY})_2\text{BPY}(\text{MeOH})_2][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ EM DMSO-D6.	23
FIGURA 3.7: COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, TAMBÉM DENOMINADO POR F01, COM AS NUMERAÇÕES ATRIBUÍDAS AOS PROTÕES PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO NOS ESPETROS DE RMN.	23
FIGURA 3.8: COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA-GLUC})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, TAMBÉM DENOMINADO POR F02, COM AS NUMERAÇÕES ATRIBUÍDAS AOS PROTÕES PARA A SUA IDENTIFICAÇÃO NOS ESPETROS DE RMN.	25
FIGURA 3.9: ESPETROS DE ^1H -RMN DOS COMPLEXOS F01 E F02, EM CLOROFÓRMIO-D. * SINAIS ATRIBUÍDOS A SOLVENTES: 7,26 PPM CORRESPONDE AO CDCl_3 ; 3,16 E 1,35 CORRESPONDEM A ÉTER DIETÍLICO; 1,25 E 0,86 PPM CORRESPONDEM A N-HEXANO. [47]	26
FIGURA 3.10: ESPETRO DE ^1H -RMN DO COMPLEXO F02 EM ACETONA-D6 SECA A CERCA DE 44°C. O ESPETRO A FOI FEITO APÓS ADIÇÃO DE ALGUMAS GOTAS DE D_2O . O ESPETRO B PERTENCE À MESMA AMOSTRA, MAS FOI FEITO ANTES DA ADIÇÃO DE D_2O . OS VALORES ENTRE PARÊNTESES RETOS CORRESPONDEM ÀS INTEGRAÇÕES DOS SINAIS ACIMA DELES.	27
FIGURA 3.11: ESPETROS ELETRÔNICOS DO COMPLEXO F01 $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ EM DCM (LINHA SÓLIDA) E DMSO (TRACEJADO). AS SETAS INDICAM AS PRINCIPAIS BANDAS IDENTIFICADAS: MLCT A 456 NM (LARANJA); TRANSFERÊNCIA ILCT $\pi(\text{BPY}) \rightarrow \pi^*$ A 289-292 NM (AZUL); TRANSIÇÕES INTRALIGANDO $\pi(\text{BPY}) \rightarrow \pi^*$ A 246/247 NM (VERDE).	28
FIGURA 3.12: ESPETRO ELETRÔNICO DO COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})_3]^{2+}$ EM ACETONITRIL, EM QUE O MÁXIMO DE ABSORÇÃO DA BANDA DE MLCT SE ENCONTRA A 449 NM. ADAPTADO DE ZHOU ET. AL. [60]	29
FIGURA 3.13: ESPETRO DE FTIR DE A) DO COMPLEXO F01, $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ E B) ESPETRO DE FTIR DO COMPLEXO F03, $[\text{Ru}(\text{BPY})_2\{\text{BPY}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.	30
FIGURA 3.14: A) ESPETROS DE EMISSÃO NORMALIZADOS DOS COMPLEXOS F01, F02 E F03 EM DMSO(2%)/HEPES ($\lambda_{\text{exc}} = 455/460$ NM; $T = 25,0 \pm 0,1$ °C); B) DECAIMENTO EXPERIMENTAL DA INTENSIDADE DE EMISSÃO E RESPECTIVO AJUSTE OBTIDO PARA O COMPLEXO F01 EM DMSO(2%)/HEPES ($\chi^2 = 1,00$; $\lambda_{\text{exc}} = 460$ NM; $\lambda_{\text{em}} = 630$ NM) O AJUSTE FOI EFETUADO USANDO UMA FUNÇÃO DE SOMA DE EXPONENCIAIS (VER PARTE EXPERIMENTAL, EQUAÇÃO 5.2).	31
FIGURA 3.15: DIAGRAMA DE JABLONSKI, ADAPTADO DE [62].	33
FIGURA 3.16: VOLTAMOGRAMA DO COMPLEXO F02 $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA-GLUC})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ EM ACETONITRIL, $N=200$ MV/S. OS VOLTAMOGRAMAS A TRACEJADO REFEREM-SE AO ISOLAMENTO DE PROCESSOS DAS BIPYRIDINAS ENTRE -1 V E -1,6 V (ROSA) E ENTRE -1,4 V E -2 V (VERDE), $N=200$ MV/S.	36
FIGURA 3.17: VOLTAMOGRAMA DO COMPLEXO F02 $[\text{Ru}(\text{BPY})_2(\text{BPY-PLA-GLUC})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ EM DICLOROMETANO, $N=200$ MV/S.	37

FIGURA 4.1: ESTABILIDADE DO COMPLEXO F01 EM DMSO(1%)/HEPES A 25 ± 3 °C: CIMA - EVOLUÇÃO DO ESPECTRO DE UV-VIS OBTIDO PARA UMA SOLUÇÃO DE COMPLEXO DE CONCENTRAÇÃO 45,0 μ M AO LONGO DE 27,42 HORAS; BAIXO - VARIAÇÃO (EM %) DA INTENSIDADE DO ESPECTRO AOS VALORES DE COMPRIMENTO DE ONDA INDICADOS. ($T_0 = 4$ MIN, T_{MIX} REFERE-SE AO MOMENTO EM QUE O COMPLEXO FOI DISSOLVIDO EM DMSO, 4 MINUTOS ANTES DE T_0 .) O COMPLEXO MANTÉM A SUA INTEGRIDADE ATÉ UMA EXTENSÃO DE 86,4% AO FIM DAS 27 HORAS.....	39
FIGURA 4.2: ESTABILIDADE DO COMPLEXO F01 EM DMSO(5%)/DMEM A 25 ± 3 °C: CIMA - EVOLUÇÃO DO ESPECTRO DE UV-VIS OBTIDO PARA UMA SOLUÇÃO DE COMPLEXO DE CONCENTRAÇÃO 39,7 μ M AO LONGO DE 24 HORAS; BAIXO - VARIAÇÃO (EM %) DA INTENSIDADE DO ESPECTRO AOS VALORES DE COMPRIMENTO DE ONDA INDICADOS. ($T_0 = 14$ MIN, T_{MIX} REFERE-SE AO MOMENTO EM QUE O COMPLEXO FOI DISSOLVIDO EM DMSO, 14 MINUTOS ANTES DE T_0 .) O COMPLEXO MANTÉM A SUA INTEGRIDADE ATÉ UMA EXTENSÃO DE 88,0% AO FIM DAS 24 HORAS.	41
FIGURA 4.3: REPRESENTAÇÃO DA ALBUMINA SÉRICA HUMANA, ADAPTADO DE [78], COM A LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE SUDLOW I E II.	42
FIGURA 4.4: ESPETRO DE EMISSÃO DE UMA SOLUÇÃO DE COMPLEXO F01 E HSA (1:1) DE CONCENTRAÇÃO 5 μ M EM DMSO(2%)/HEPES, QUANDO EXCITADA A 295 NM (LINHA AZUL; $\Lambda_{EM(MAX)} = 340$ NM – EMISSÃO REFERENTE À PROTEÍNA) E 455 NM (LINHA LARANJA; $\Lambda_{EM} = 340$ NM – EMISSÃO REFERENTE AO COMPLEXO).....	44
FIGURA 4.5: GRÁFICO COM A REPRESENTAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DAS INTENSIDADES RELATIVAS DO TRP214 ($\Lambda_{EXC} = 295$ NM; $\Lambda_{EM} = 340$ NM) NO ESTUDO POR FLUORESCÊNCIA EM DMSO(2%)/HEPES A $25 (\pm 0,1)$ °C DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS F01, F02 E F03 COM HSA, MANTENDO C_{HSA} CONSTANTE E AUMENTANDO $C_{COMPLEXO}$	45
FIGURA 4.6: INTERAÇÃO DO COMPLEXO F01 COM A ALBUMINA HUMANA: GRÁFICO DE STERN-VOLMER ($\Lambda_{EM} = 340$ NM) OBTIDO PARA SOLUÇÕES DE HSA E F01, INCUBADAS DURANTE 22 HORAS A 37°C EM DMSO(2%)/HEPES, PH = 7,4 ($C_{HSA} = 4,58$ μ M, $C_{COMPLEXO} = 0$ A 25 μ M, $T = 25 \pm 0,1$ °C).	47
FIGURA 4.7: GRÁFICO DAS INTENSIDADES RELATIVAS DO COMPLEXO F01 ($C = 4,88$ μ M) COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE HSA EM DMSO(2%)/HEPES. ($\Lambda_{EXC} = 455$ NM E $\Lambda_{EM} = 630$ NM).	48
FIGURA 4.8: RESULTADOS DE VIABILIDADE CELULAR NA LINHA CELULAR A2780 (ADENOCARCINOMA DO OVÁRIO HUMANO, SENSÍVEL À CISPLATINA) PARA O COMPLEXO F01. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI 48 HORAS.	49
FIGURA 5.1: ESQUEMA SIMPLIFICADO DOS ENSAIOS POR ESPETROSCOPIA DE EMISSÃO.	56

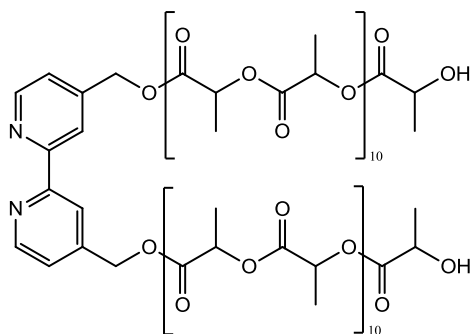
FIGURA 5.2: GRÁFICO DE STERN-VOLMER DE EMISSÃO EM ESTADO ESTACIONÁRIO I_0/I_F (LINHA A VERDE) OU RESOLVIDA NO TEMPO, T_0/T COM $[Q]$ (TRACEJADO A AZUL) PARA UM PROCESSO DE EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR MECANISMOS ESTÁTICO E DINÂMICO EM SIMULTÂNEO. [62]	59
FIGURA 5.3: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO PRECURSOR $[Ru(BPY)_2Cl_2]$.	61
FIGURA 5.4: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO COMPLEXO F01, $[Ru(BPY)_2(BPY-PLA)][CF_3SO_3]_2$.	63
FIGURA 5.5: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO COMPLEXO F02, $[Ru(BPY)_2(BPY-PLA-GLUC)][CF_3SO_3]_2$.	64
FIGURA 5.6: ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DO COMPLEXO F03, $[Ru(BPY)_2BPY(MEOH)_2][CF_3SO_3]_2$.	65

Índice de Tabelas

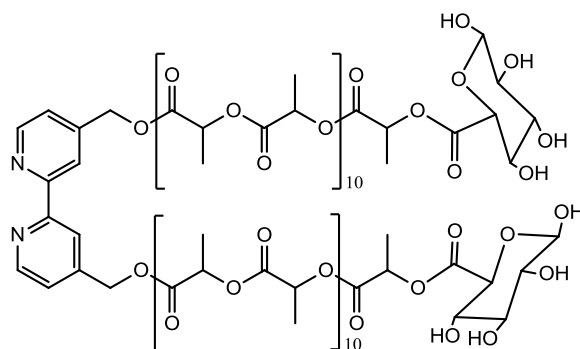
TABELA 1.1: VALORES DE IC ₅₀ (μM) OBTIDOS AO FIM DE 72H AO TRATAR ALGUMAS LINHAS CELULARES DE CANCRO HUMANO COM OS COMPLEXOS TM34 E CISPLATINA. [24], [29].....	8
TABELA 1.2: VALORES DE IC ₅₀ (μM) PARA INIBIÇÃO DE PARP1 APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C. [24].....	8
TABELA 1.3: VALORES DE IC ₅₀ (μM) OBTIDOS AO TRATAR A LINHA CELULAR MCF7 (CANCRO HUMANO DA MAMA) COM OS COMPLEXOS [Ru(BPY) ₂ DPPN]Cl ₂ , RUPMC E CISPLATINA. TODOS OS COMPLEXOS FORAM INCUBADOS A 37°C DURANTE 72 HORAS. [28], [38]	10
TABELA 1.4: VALORES DE IC ₅₀ (μM) OBTIDOS AO TRATAR AS LINHAS CELULARES HeLa, MCF7, MCF10 E HEPG2 (CANCRO HUMANO CERVICAL, DA MAMA, DA MAMA EPITELIAL E CARCINOMA DO FÍGADO HEPATOCELULAR, RESPECTIVAMENTE) COM OS COMPLEXOS [Ru(PHPY)(BPY)(DPPN)] ⁺ [40], [Ru(PHEN) ₂ (DPPZ)](PF ₆) ₂ [39] E CISPLATINA.	10
TABELA 2.1: ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE ¹ H-RMN PARA O LIGANDO BPY-PLA EM ACETONITRILÓ-D ₃ , COM OS RESPECTIVOS DESVIOS QUÍMICOS, INTEGRAÇÕES, MULTIPLICIDADES E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO.	15
TABELA 2.2: ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE ¹ H-RMN PARA O LIGANDO BPY-PLA-GLUC EM CLOROFÓRMIO-D, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS QUÍMICOS, INTEGRAÇÕES E MULTIPLICIDADE..	18
TABELA 3.1: VALORES CALCULADOS E OBTIDOS EM ANÁLISE ELEMENTAR DO COMPLEXO F03.....	20
TABELA 3.2: TABELA DAS ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ¹ H-RMN PARA O COMPLEXO F03 EM DMSO-D ₆ (FIGURA 3.3), COM OS RESPECTIVOS DESVIOS QUÍMICOS, ATRIBUIÇÕES AOS SINAIS DE ¹³ C-RMN, INTEGRAÇÕES, MULTIPLICIDADES E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO.....	21
TABELA 3.3: ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE ¹ H-RMN PARA O COMPLEXO F01 EM CLOROFÓRMIO-D, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS QUÍMICOS, ATRIBUIÇÕES AOS SINAIS DE ¹³ C-RMN, INTEGRAÇÕES E MULTIPLICIDADE, EM CLOROFÓRMIO-D.	24
TABELA 3.4: ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE ¹ H-RMN PARA O COMPLEXO F02 EM CLOROFÓRMIO-D, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS QUÍMICOS, ATRIBUIÇÕES AOS SINAIS DE ¹³ C-RMN, INTEGRAÇÕES E MULTIPLICIDADE, EM CLOROFÓRMIO-D.	25
TABELA 3.5: VALOR DA INTEGRAÇÃO DOS SINAIS DE INTERESSE NOS ESPECTROS DE ¹ H-RMN NO ESTUDO DO COMPLEXO F02 ANTES E APÓS ADIÇÃO DE D ₂ O (REFERENTE À FIGURA 3.10).	27
TABELA 3.6: RESULTADOS OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO PARA OS COMPLEXOS F01 A F03 EM EM DMSO(2%)/HEPES. O TEMPO DE VIDA MÉDIO DO ESTADO EXCITADO (T ₀) FOI OBTIDO POR AJUSTE DOS DECAIMENTOS DE INTENSIDADE OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE À EQUAÇÃO $\tau = i = 1/n\alpha i \tau i$ (T = 25,0 ± 0,1 °C) ; OUTRAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS – VER SECÇÃO 5.2.4) .	32

TABELA 3.7: CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS F01, F02 E F03, BEM COMO DO COMPLEXO PRECURSOR $[\text{Ru}(\text{BPY})_2\text{Cl}_2]$, LIGANDOS BPY, $\text{BPY}(\text{CH}_2\text{OH})_2$, E COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{BPY})_3]^{2+}$ POR VOLTAMETRIA CÍCLICA, EM ACETONITRILO E DICLOROMETANO.	35
TABELA 4.1: VALORES DE K_B , $\text{LOG } K_{SV}$, E K_D PARA OS COMPLEXOS F01 E F02, OBTIDOS DO GRÁFICO DE STERN-VOLMER POR UM AJUSTE LINEAR ($N = 8$ E 10 PONTOS).	47
TABELA 4.2: RESULTADOS DE CITOTOXICIDADE, EXPRESSA EM μM , PARA OS COMPLEXOS F01, F02 E F03 NAS LINHAS CELULARES A2780, MCF7 E FIBROBLASTOS, COM TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 48H A 37°C	50
TABELA 5.1: LISTA DE REAGENTES USADOS NO DECORRER DESTE TRABALHO.	52
TABELA 5.2: LISTA DE SOLVENTES USADOS NO DECORRER DESTE TRABALHO.	53
TABELA 5.3: LISTA DOS SOLVENTES DEUTERADOS USADOS EM RMN.	53

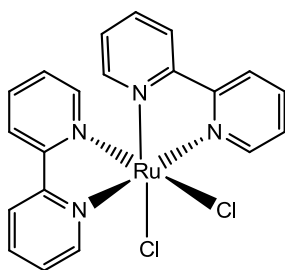
Índice de Ligandos e complexos



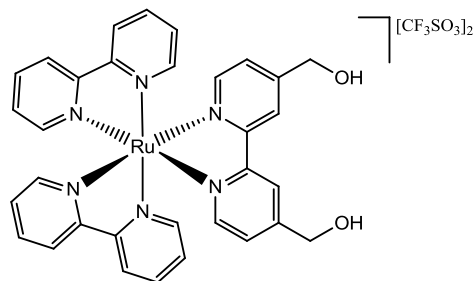
Ligando **Bpy-PLA**



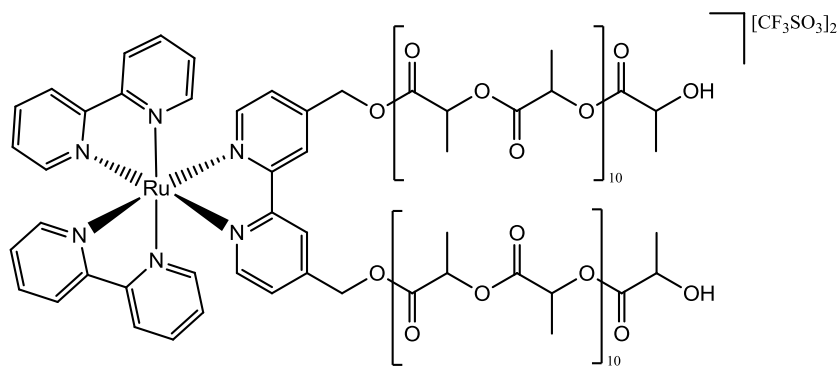
Ligando **Bpy-PLA-Gluc**



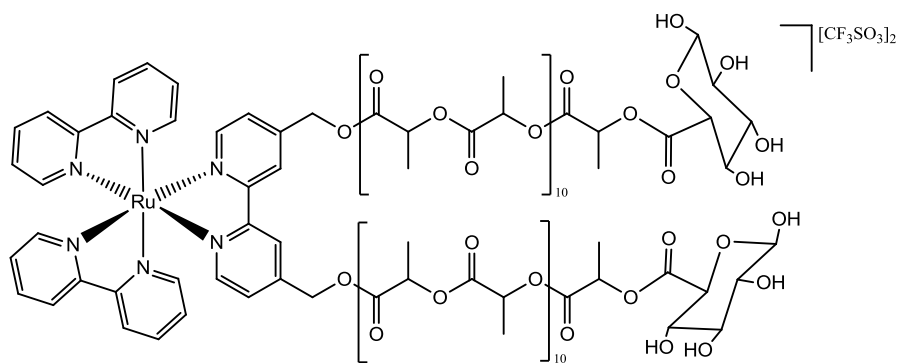
Complexo precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]



[Ru(bpy)₂{bpy(MeOH)₂}] [CF₃SO₃]₂ (complexo **F03**)



[Ru(bpy)₂(bpy-PLA)] [CF₃SO₃]₂ (complexo **F01**)



[Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)] [CF₃SO₃]₂ (complexo **F02**)

Símbolos e Abreviaturas

ACN: Acetonitrilo

Bpy: Bipyridina

comp: Sinal complexo

Cp: Ciclopentadienilo

CV: *Cyclic Voltametry*, ou Voltametria Cíclica

d: Dupleto

DCM: Diclorometano

DMAP: 4-Dimetilaminopiridina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, um meio de cultura celular

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Desoxyribonucleic acid*, ou ácido desoxirribonucleico

DP: *Degree of polymerization*, ou grau de polimerização

EPR: *Enhanced Permiation and Retention [effect]*, ou efeito de permeação e retenção melhorada

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, ou Espetroscopia Eletrônica por Transformada de Fourier

Gluc: Ácido *D*-glucurônico

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico

HSA: *Human Serum Albumin*, ou Albumina sérica Humana

hTf: *Human Transferrin*, ou transferrina humana

ILCT: *Intraligand charge transfer*, ou transferência de carga intraligando

Im: Imidazole

Ind: Indazole

LMCT: *Ligand-Metal Charge Transfer*, ou transferência de carga ligando-metal

m: Multiplete

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou dessorção/ionização a laser assistida por matriz

MLCT: *Metal-Ligand Charge Transfer*, ou transferência de carga metal-ligando

NAC: *N-acetylcysteine antioxidant*, ou antioxidante *N*-acetilcisteína

NSCLC: *Non-small cell lung cancer*, ou cancro do pulmão de células não pequenas

PARP: *Poly(ADP-ribose) polymerase*, ou Polimerase Poli(ADP-ribose)

PBS: *Phosphate-buffered saline*, ou tampão fosfato-salino

Pddn: *Benzo[i]-dipirido[3,2-a:2',3'-c]phenazine*, ou benzo[i]-dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina

PDT: *Photodynamic Therapy*, ou terapia fotodinâmica

PLA: Polilactídeo

ppm: Parte por milhão

PTA: 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano

q: Quarteto

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROS: *Reactive oxygen species*, ou espécies reativas de oxigénio

s: Singuleto

Sh: *shoulder*, ou ombro

t: Tripleto

TCSPC: *Time-Related Single-Photon Counting*, ou técnica de cronometragem de um fóton único

TEA: Trietilamina

THF: Tetrahydrofurano

TLC: *Thin Layer Chromatography*, ou cromatografia em camada fina

TOF: *Time of Flight*, ou tempo de voo

u.a.: Unidade arbitrária

W.H.O.: *World Health Organization*, ou Organização mundial da Saúde

Capítulo 1 - Introdução

1.1. O cancro

O cancro é a maior causa de morte a nível mundial, sendo a segunda maior em países desenvolvidos. Dados de 2012 fornecidos pela W.H.O. (*World Health Organization*) indicam que nesse ano morreram cerca de 8,2 milhões de pessoas em todo o mundo devido a causas relacionadas com cancro, com perspectivas de esse número vir a aumentar cerca de 70% nas duas décadas seguintes. [1]

Os principais tipos de cancro que surgem nos homens são os do pulmão, próstata, colorrectal, estômago e fígado. Nas mulheres há maior incidência de cancros da mama, colorrectal, pulmão, cervical e do estômago. [1]

O aparecimento de tumores malignos é causado frequentemente pelo contacto com agentes externos, como exposição excessiva a radiação ultravioleta e químicos carcinogénicos que podem ser encontrados na alimentação. Alguns constituintes do tabaco e tipos de infeções podem também causar lesões pré-cancerosas. [2] Estes agentes provocam alterações genéticas nas células que perdem a sua diferenciação, adotando então comportamentos erráticos. O seu crescimento torna-se acelerado e descontrolado e ganham também uma longevidade superior às células saudáveis.

As células tumorais podem também desagregar-se do tumor principal e migrar pelo organismo, afetando outros órgãos. A este processo chama-se metastização e é a causa mais comum de morte relacionada com cancro. As metástases são lesões tumorais secundárias que se originam quando células de um tumor original se dissociam, e viajam pelo organismo até se fixarem num outro sítio, onde se multiplicam e criam uma nova colónia. Mais alarmante é o facto de em 90% dos casos serem estes, e não os tumores originais, a causa de morte. [3]

Se o tumor for detetado a tempo, as opções de tratamento incluem a remoção cirúrgica, o tratamento por quimioterapia ou também a radioterapia. A quimioterapia é muitas vezes o método terapêutico selecionado, no entanto esta terapia apresenta algumas desvantagens. Não só é um procedimento muitas vezes moroso, como os fármacos atualmente utilizados para tal apresentam efeitos secundários debilitantes de curto e longo prazo que diminuem a qualidade de vida dos pacientes. Entre os efeitos de curto prazo estão a fadiga, náusea, vômitos, queda de cabelo e tromboembolismo (coagulação nos vasos sanguíneos). Os efeitos de longo prazo incluem menopausa prematura, infertilidade, perda de peso, disfunções cardíacas e leucemia. [4]

Os fármacos utilizados em quimioterapia podem ser compostos orgânicos e complexos de coordenação, sendo estes últimos o foco deste trabalho.

1.2. Metalofármacos e a sua aplicação em quimioterapia

1.2.1 Cisplatina e derivados

No que refere à modelação de fármacos (alteração da sua estrutura por substituição ou funcionalização de ligandos), uma grande vantagem que os complexos de coordenação têm sobre os compostos orgânicos é a maior diversidade de geometrias que podem assumir. Isto é possível graças à quantidade de isómeros que se podem sintetizar, à variedade de moléculas orgânicas que se podem coordenar aos metais e aos diversos estados de oxidação em que o centro metálico pode estar. [5]

A cisplatina (*cis*-diaminadichloroplatina(II), Figura 1.1) foi sintetizada pelo químico italiano Michele Peyrone pela primeira vez em 1844. [6] A sua atividade citotóxica foi identificada e publicada em 1965 por Barnett Rosenberg *et. al.*, entrando rapidamente em uso clínico. [7] O mecanismo de ação da cisplatina passa pela formação de aductos com as cadeias do DNA, impedindo assim a sua replicação. [8] Apesar do seu continuado uso, a cisplatina provoca efeitos secundários muito adversos e não é eficaz contra os mecanismos de resistência das células tumorais. [9]

A resistência ao tratamento com fármacos anticancerígenos pode variar de paciente para paciente. Pode resultar de diferenças genéticas em células tumorais, mesmo que o tecido circundante não partilhe essa mutação. A resistência pode ser intrínseca ao tumor, mas pode também ser adquirida. A resistência adquirida pode ser consequência da expressão de um ou vários transportadores, que detetam e expõem o fármaco das células cancerígenas. É também possível desenvolver insensibilidade aos fármacos. Estes são mecanismos que surgem naturalmente nos seres vivos para os proteger de toxinas no ambiente circundante. [10]

Tendo em vista este problema, no final do século XX surgiram dois novos complexos modelados com base na cisplatina. São eles a carboplatina ((*cis*-diamina-(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II)) e a oxaliplatina ((*trans*-R,R-ciclohexano-1,2-diamina)oxalatoplatina(II)). (Figura 1.1)

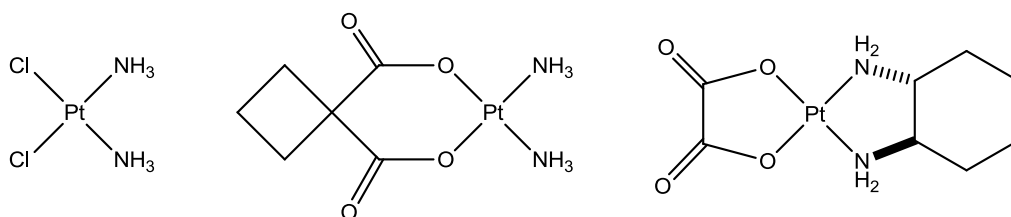


Figura 1.1: Estruturas da cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, por essa ordem.

A carboplatina foi o primeiro derivado da cisplatina a entrar em uso clínico. Os resultados mostraram que, por ser uma molécula mais estável, não é tão reativa como a sua antecessora. [8] Por outro lado, apresenta menor toxicidade para os sistemas urinário e gastrointestinal, e podem ser usadas maiores doses ou prolongar o período de tratamento. [8], [11] Deste modo, a carboplatina substituiu a cisplatina em tratamentos de cânceros mais avançados, metastizados, ou cânceros recorrentes do pulmão e ovários. Por outro lado, não foi possível com este fármaco resolver os problemas de resistência.

Com a síntese da oxaliplatina surgiu finalmente uma alternativa que, por se ligar de forma diferente ao DNA relativamente à cisplatina, elimina os problemas de resistência: os aductos formados não são reconhecidos pelas proteínas reparadoras do DNA. Há também indícios de que este complexo não interatua com o transportador CTR1, que resultaria na sua expulsão da célula-alvo. Assim, tumores resistentes como o colorrectal são os alvos terapêuticos de eleição para a oxaliplatina. Por outro lado, apesar de esta ser menos tóxica que a cisplatina, é necessário controlar a dosagem de oxaliplatina pois podem surgir efeitos secundários como neuropatia sensorial, que danifica o sistema nervoso, causando diminuições de mobilidade ou sensibilidade. [8]

1.2.2. Complexos de ruténio

Para contornar os problemas dos fármacos atualmente utilizados, várias equipas de investigação têm dirigido os seus esforços no sentido de sintetizar novos fármacos, utilizando diversos metais de transição como o ferro, cobre, paládio, ouro, tungsténio, ósmio e ruténio. [5]

No contexto deste trabalho foi feito um estudo mais aprofundado de complexos cujo centro metálico é o ruténio. Os complexos de ruténio conquistaram o interesse da comunidade científica quando em 1980 Clarke M. J. *et. al.* [12] expuseram os seus resultados de testes com complexos de ruténio, chegando à conclusão que estes complexos e seus derivados poderiam apresentar maior seletividade para células cancerígenas.

Deste então têm vindo a ser desenvolvidos inúmeros complexos de ruténio, alguns com resultados bastante promissores, e que atuam por mecanismos distintos dos complexos de platina. Têm também sido estudadas as interações dos compostos de ruténio com os seus alvos biológicos prováveis, como o DNA, RNA, transferrina, albumina e citocromo C. [13]

Os resultados têm-se mostrado muito prometedores. Não só têm surgido compostos com crescente seletividade, como também tem sido possível contornar os problemas de resistência que frustraram esforços anteriores. [9]

De um modo mais específico, o ruténio tem um conjunto de características que o tornam um metal elegível para a modelação de metalofármacos. Duas delas são a sua facilidade em ligar-se aos

heteroátomos oxigénio e azoto, e assumirem preferencialmente a geometria octaédrica. Estas características conferem aos complexos de ruténio a capacidade de serem modelados de acordo com os alvos em vista, e potencialmente a capacidade de se ligarem a ácidos nucleicos, se for esse o mecanismo de ação. [9]

Outra característica importante do ruténio é este mimetizar o ferro na forma como se pode ligar a biomoléculas como a transferrina e a albumina. A albumina é uma proteína transportadora não específica enquanto que a transferrina tem particular afinidade para a captação de iões Fe(III). [1], [14], [15] Em mamíferos, ambas as proteínas solubilizam e transportam o ferro pelo organismo. Tira-se assim partido de um método de transporte já existente no organismo, o que poderá reduzir a toxicidade do ruténio. [13], [16], [17]

Como as células em rápido crescimento (como as tumorais) requerem mais ferro, aumentam a expressão de recetores de transferrina na sua membrana. Testes *in vivo* em vários tipos de células revelam que nas cancerígenas a quantidade de ruténio que adere a estas é 2 a 12 vezes mais que em células saudáveis. [18]

Adicionalmente, complexos deste metal podem encontrar-se em vários estados de oxidação (II, III e IV) em condições fisiológicas. [5], [13] Complexos de Ru(III), por exemplo, são por vezes desenhados para atuarem como pró-fármacos, circulando pelo organismo inertes (via proteínas transportadoras), até chegarem ao tumor. Aí, o ambiente em hipóxia (baixa concentração de oxigénio) dos tumores, sendo um meio redutor, induziria a redução do Ru(III) a Ru(II), que se tornaria citotóxico levando à apoptose das células tumorais. [12], [18] O consumo elevado de ferro por parte das células cancerígenas constitui também um argumento a favor da utilização de ruténio, uma vez que este é um bom mimético do ferro quando coordenado, e assim também este fator contribui para a sua acumulação nos tecidos-alvo, como já foi referido anteriormente. [9]

Em suma, o ruténio é um metal de transição que confere versatilidade na escolha de ligandos a que a ele se podem coordenar, estado de oxidação e geometria de coordenação. Estas características possibilitam a modelação de complexos muito distintos, podendo ser desenhados de forma personalizada consoante o tipo de interações, alvos e mecanismos de ação que os investigadores desejarem explorar.

1.2.3. NAMI-A e KP1019: pioneiros dos metalofármacos de ruténio

Os primeiros complexos de ruténio utilizados em testes clínicos foram o NAMI-A e o KP1019 (Figura 1.2). Estes já completaram a fase I de testes clínicos, tendo avançado para a fase II. [17], [19]

O NAMI-A ([ImH][trans-RuCl₄(DMSO)(Im)], onde Im = imidazole e DMSO = dimetilsulfóxido) não é muito citotóxico para células tumorais, sendo necessárias concentrações elevadas (a partir de 0,1

mM *in vitro*) para surgirem efeitos relevantes. Por outro lado mostrou ser muito eficaz no tratamento de metástases, como as do carcinoma mamário MCa. [9] Esta eficácia mostrou também ser independente do estágio do tumor primário, e do número e tipo de tratamentos a que o paciente já foi sujeito. A atividade do NAMI-A é também significativamente maior que a da cisplatina em metástases do cancro pulmonar H460M2 (testado em ratinhos), no entanto a combinação de ambos pode ser sinérgica. [9]

Nas metástases, os efeitos do NAMI-A fizeram-se sentir não só no seu tratamento, como também na prevenção da sua proliferação: *in vitro* verificou-se que este complexo previne a desagregação das células tumorais por mecanismos que induzem o aumento da aderência celular. [20] Se ainda assim a célula se desprender do tumor principal, o NAMI-A limita a sua mobilidade ao interferir com a estrutura do citoesqueleto. Adicionalmente este complexo tem um efeito antiangiogénico, que se trata de qualquer mecanismo que prive as células cancerígenas de oxigénio e nutrientes. [21] Outro efeito benéfico do NAMI-A é o reforço de tecidos conectivos na matriz extracelular da vizinhança do tumor. Estes formam uma espécie de cápsula biológica que bloqueia a passagem das células malignas para o sistema circulatório. [22]

Testes *in vivo* em ratinhos evidenciaram, no entanto, as principais falhas deste metalofármaco: o NAMI-A tende a concentrar-se em tecidos ricos em colagénio. Isto significa que, apesar da especificidade deste complexo para metástases de certos tipos de cancro, ele vai também afetar os tecidos saudáveis dos rins e do fígado, o que lhe confere alguma toxicidade. [9]

Por outro lado, o metalofármaco KP1019 ([IndH][*trans*-RuCl₄(Ind)₂], onde Ind = indazole) mostrou melhores resultados no tratamento de cancro colorrectal em testes *in vivo* em ratinhos, e mais recentemente também mostrou bons resultados no tratamento do carcinoma do cólon MAC15A, que é um tipo de cancro com resistência a quimioterapia. [9]

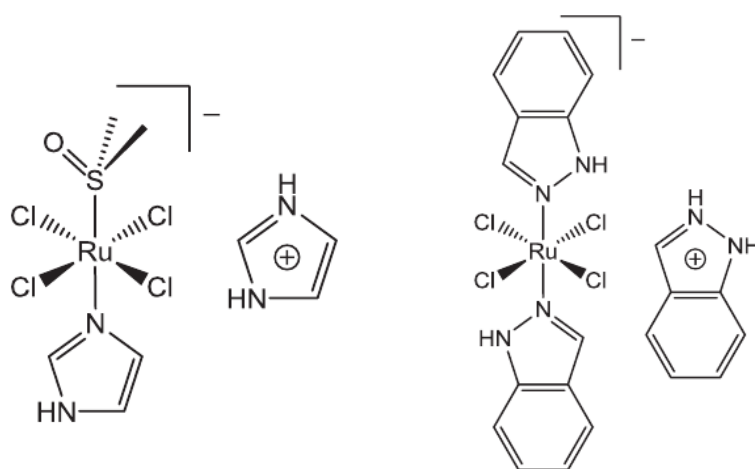


Figura 1.2: Estruturas dos complexos NAMI-A à esquerda e KP1019 à direita. Adaptado de Bergamo *et. al.* 2012. [9]

Testes utilizando o antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC) revelaram que o KP1019 também induz a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), uma vez que a atividade do complexo foi reduzida quando na presença do antioxidante. [16]

No que toca à interação com o DNA, o KP1019 forma ligações cruzadas DMA-DNA e DNA-proteína, tal como a cisplatina, mas com muito menor intensidade (cerca de 15 vezes menor). Não é por isso esta a via preferencial de atuação deste complexo. [9]

De forma mais sucinta, o NAMI-A e o KP1019 foram os primeiros complexos de ruténio a chegar à fase dos ensaios clínicos. Enquanto o KP1019 trata alguns tumores primários, o NAMI-A destaca-se na prevenção e tratamento de metástases.

Similarmente à cisplatina, o KP1019 também forma ligações com o DNA, mas os mecanismos não são os mesmos nem os únicos pelos quais ele atua, o que permite ao KP1019 contornar os problemas de resistência que diminuem a atividade da cisplatina. Por outro lado tem a desvantagem de não ser tão citotóxico.

O NAMI-A tem uma citotoxicidade mais fraca [23] mas previne e trata as metástases, o que é muito importante devido à escassez de fármacos que o fazem e aos níveis de mortalidade que as metastizações provocam.

1.2.4. Compostos de ruténio organometálicos e de coordenação

O RAPTA-T e o RM175 (Figura 1.3) são dois exemplos mais recentes de complexos organometálicos em fases avançadas de estudos pré-clínicos, com fortes perspetivas de virem a passar a testes clínicos. Ambos pertencem àquela que é provavelmente a mais numerosa família de complexos do tipo “ruténio(II)-areno”, caracterizados pela sua estrutura em “banco de piano”. [24]

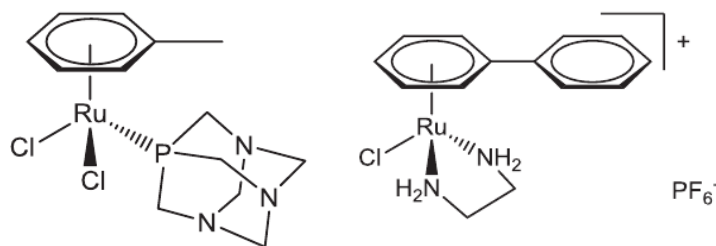


Figura 1.3: Estruturas dos complexos RAPTA-T à esquerda, RM175 à direita. Adaptado de Bergamo *et. al.*, 2012. [9]

O RAPTA-T ($[\text{Ru}(\text{II})\text{Cl}_2(\eta^6\text{-toluene})(\text{PTA})]$, onde PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) surgiu como alternativa ao NAMI-A no tratamento de metástases. O fragmento PTA deste complexo é o que lhe confere ativação seletiva no meio hipóxico dos tumores sólidos, onde depois de protonado (devido

ao baixo pH), interage com o DNA, danificando-o. [25] No entanto, este complexo, tal como os outros da sua família, tem uma citotoxicidade fraca, embora a atividade seja maior em células tumorais do que em células saudáveis. A vantagem da utilização do RAPTA-T está na sua capacidade de alterar o comportamento celular em termos de invasão e metastização, uma vez que este complexo induz uma alteração do citoesqueleto das células cancerígenas, originando um fenótipo com capacidade reduzida de migrar e metastizar. Deste modo, embora a sua eficácia seja apenas moderada, este foi o primeiro complexo de ruténio a surgir depois do NAMI-A com seletividade para metástases. [9]

O complexo RM175 (ou ONCO4417 se o contra-íão PF_6^- for substituído por Cl^-) foi desenhado para ter o DNA como alvo e simultaneamente contornar os problemas de resistência que a cisplatina apresenta. [9], [17], [26] Este complexo pode ligar-se ao DNA covalentemente e por intercalação do areno. [9] Testes *in vitro* revelaram que o ONCO4417 tem eficácia comparável aos complexos de platina nos tumores do pulmão, ovário, esófago, pâncreas, colorrectal e também em melanoma. [17] Ficou também documentado que o seu modo de atuação passa pela interrupção das fases G1, G2 e M (Figura 1.4; [27]) do ciclo celular, levando à apoptose. *In vivo*, foi registado um grande abrandamento de crescimento dos tumores. [3], [26]

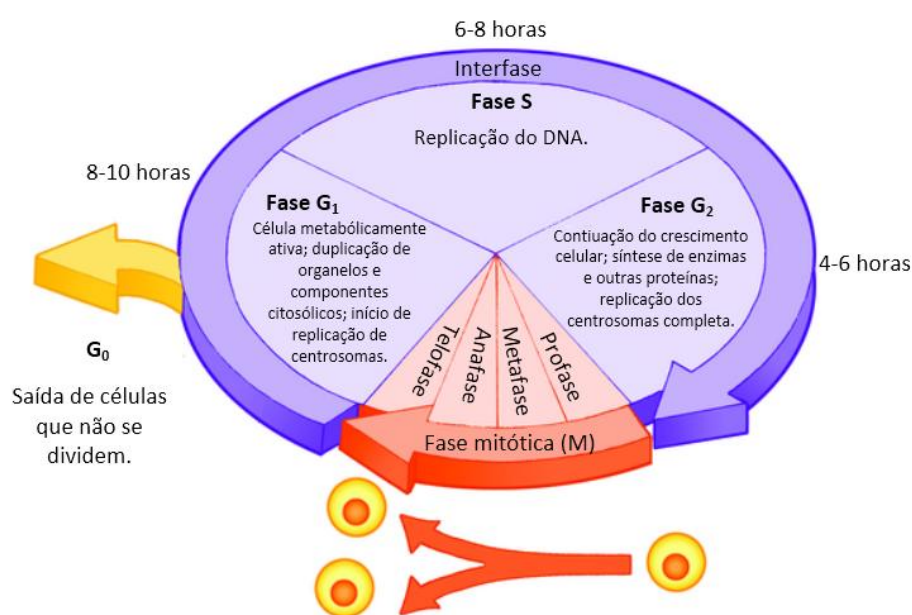


Figura 1.4: Esquema do ciclo celular. [27]

Nos últimos anos o grupo de Química Organometálica do Centro de Química Estrutural da FCUL tem vindo a desenvolver, entre outros, complexos de ruténio (II) com ligandos ciclopentadienilo ($\eta^5\text{-Cp}$), cuja estrutura geral se encontra representada na Figura 1.5A, onde L é um ligando monodentado e X representa um heteroátomo do ligando bidentado. [5], [24], [28]

Num estudo realizado por Tomaz *et. al.* [24] foi testada a citotoxicidade do complexo ([Ru(II)Cp(bpy)(PPh₃)] [CF₃SO₃] (ou TM34; Figura 1.5B), que mostrou ter boa atividade *in vitro* contra o adenocarcinoma do ovário resistente e não resistente à cisplatina (A2780, A2780cisR, respetivamente), adenocarcinoma da mama mama hormono-dependente (MDAMB231) e cancro da próstata (PC3), sendo que já se conhecia a sua boa citotoxicidade contra leucemia (HL60). [29] Este complexo revelou ser particularmente eficaz contra a linha celular resistente à cisplatina, mostrando nesta os valores de IC₅₀ mais favoráveis (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Valores de IC₅₀ (μM) obtidos ao fim de 72h ao tratar algumas linhas celulares de cancro humano com os complexos TM34 e cisplatina. [24], [29]

	A2780	A2780cisR	MCF7	PC3	HL60
TM34	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,54 ± 0,10	0,42 ± 0,25
Cisplatina	2,5 ± 0,3	14 ± 2,2	28 ± 6	51 ± 7	2,15 ± 0,1

Verificou-se também que o complexo TM34 é um inibidor da proteína PARP1 (Polimerase Poli(ADP-ribose) 1), que é responsável pela regulação de processos celulares como a atividade de substratos, reparação de DNA, regulação de transcrição proteica e morte celular. [30], [31] Os valores apresentados na Tabela 1.2 revelam que o complexo TM34 é muito mais eficaz na inibição desta proteína que os complexos NAMI-A e cisplatina.

Tabela 1.2: Valores de IC₅₀ (μM) para inibição de PARP1 após 24 horas de incubação a 37°C. [24]

Complexo	TM34	NAMI-A	Cisplatina
IC ₅₀ (μM)	1,0 ± 0,3	18,9 ± 1,6	12,3 ± 2,0

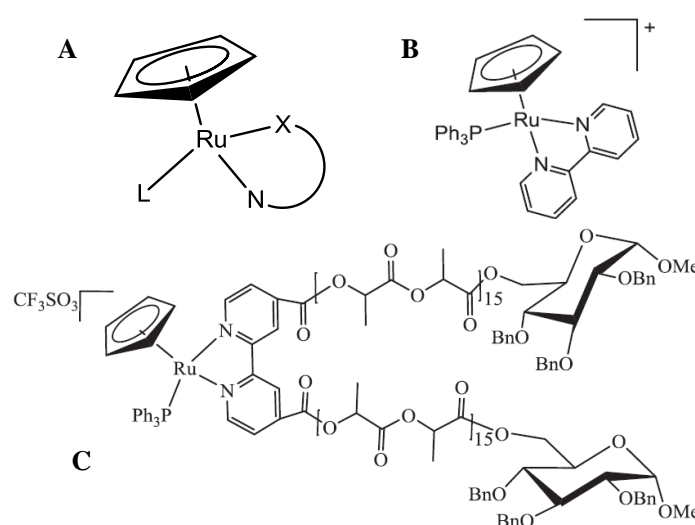


Figura 1.5: Estruturas de complexos de Ru(II): A) estrutura geral; B) estrutura do complexo designado por TM34; C) estrutura do complexo RuPMC. [5], [24], [28]

Num trabalho posterior (Valente *et. al.* [28]) partiu-se do complexo TM34, cuja bipyridina foi funcionalizada com polilactídeo contendo um derivado da glucose na extremidade oposta. Este complexo é designado RuPMC e a sua estrutura encontra-se representada na Figura 1.5C.

A sua citotoxicidade foi testada em linhas celulares humanas de cancro da mama (MCF7 e MDAMB231) e adenocarcinoma dos ovários (A2780). O complexo RuPMC mostrou ser bastante ativo em todas as linhas celulares testadas. [28]

Comparando diretamente os resultados de IC₅₀ do TM34 e do RuPMC, verifica-se que este último obtém valores superiores, sendo por isso menos citotóxico que o TM34. Apesar disso o RuPMC não perde o seu potencial anticancerígeno: devido à sua estabilidade de longa duração (pelo menos 72h) em ambiente aquoso a pH fisiológico e ao efeito EPR (ver abaixo), é possível que *in vivo* este complexo tenha maior eficácia quimioterapêutica. Dessa forma, a concentração de RuPMC necessária para produzir o mesmo efeito que o TM34 poderá eventualmente ser reduzida. [28]

O efeito de permeação e retenção melhorada (efeito EPR, ou *enhanced permeation and retention effect*) foi identificado pela primeira vez em 1986 por Maeda *et. al.* [32], e segue a premissa que as macromoléculas se acumulam seletivamente em tumores devido a defeitos na estrutura vascular dos vasos sanguíneos e drenagem linfática deficiente nas células tumorais. Assim, a seletividade dos compostos aumenta enquanto a incidência de efeitos secundários diminui.

É possível tirar partido deste efeito fazendo aumentar a massa molecular do complexo, sendo essa uma das funções da adição do polímero aos anéis da bipyridina do TM34. Adicionalmente os polímeros podem ser funcionalizados com grupos terminais, tendo em vista aumentar a sua seletividade e/ou toxicidade, como já foi exemplificado acima com a inclusão de um derivado da glucose.

A escolha de glucose e derivados para a funcionalização de compostos anticancerígenos é comum e tem origem no trabalho de investigação levada a cabo por Warburg *et. al.*, que em 1927 publicou a descoberta de que os tecidos cancerígenos consomem grandes quantidades de glucose relativamente a tecidos saudáveis. [33] Este consumo deve-se a um fenómeno de sobreexpressão da proteína GLUT-1, que se observa em vários tipos de cancro. Esta proteína encontra-se nas membranas celulares e é proteína transportadora de glucose mais comum nos seres humanos. [34] Para explorar este efeito e assim aumentar a seletividade dos compostos, a glicoconjugação tem vindo a ser, desde 1995, mais explorada nesta área. [35]

Por outro lado, os ligandos bidentados N,N'-heteroaromáticos são conhecidos por conferirem maior estabilidade aos complexos, e também versatilidade para a modelação dos complexos devido à facilidade com que podem ser funcionalizados, podendo servir de interface para a funcionalização do complexo com cadeias poliméricas. [36]

Complexos com ligandos deste tipo, como exemplificado mais abaixo, têm até hoje apresentado atividades antitumorais bastante prometedoras. Esta atividade tem muitas vezes sido atribuída a interações com o DNA, quer por intercalação dos anéis aromáticos com as bases azotadas, quer por coordenação nos casos em que o complexo apresenta um ligando facilmente substituível, como um ião cloreto. [37] No entanto, como seguidamente será abordado, o DNA não é o seu único alvo possível.

Alguns estudos com complexos de ruténio contendo apenas ligandos bidentados N,N'-heteroaromáticos revelaram que este tipo de complexos pode acumular-se preferencialmente na membrana celular. [38] Em ensaios realizados com linhas celulares humanas de cancro do cólon (HT29) e mama (MCF7), tanto a extensão desta acumulação como os valores de IC₅₀ mostraram ser dependentes do volume do ligando L em complexos do tipo [Ru(bpy)₂L]Cl₂. [38] Os valores de IC₅₀ do complexo mais volumoso testado por Schatzschneider *et. al.* (L = dppn, ou benzo[i]-dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) são muito semelhantes aos da cisplatina em ambas as linhas. [38] É de notar que o IC₅₀ documentado para o complexo RuPMC testado na linha MCF7 é também comparável ao da cisplatina (Tabela 1.3). [28]

Tabela 1.3: Valores de IC₅₀ (μM) obtidos ao tratar a linha celular MCF7 (cancro humano da mama) com os complexos [Ru(bpy)₂dppn]Cl₂, RuPMC e cisplatina. Todos os complexos foram incubados a 37°C durante 72 horas. [28], [38]

Complexo	[Ru(bpy) ₂ dppn]Cl ₂	RuPMC	Cisplatina
IC ₅₀ (μM)	3,3 ± 1,2	3,9 ± 1,4	2,0 ± 1,2

Outros grupos de investigação têm vindo também a descobrir complexos deste tipo com valores de IC₅₀ bastante favoráveis. Tan *et. al.* [39] obteve, de entre os seus complexos sintetizados, o [Ru(1-Py-βC)(DIP)](PF₆)₂ (DIP = 4,7-difenil-1,10-fenatrolina; 1-Py-β C = 1-(2-piridil)-β-carbolina) que, com a exceção da linha MCF10 (onde os valores são semelhantes aos da cisplatina) obteve valores de IC₅₀ entre 6 a 8 vezes inferiores aos da cisplatina nas linhas HeLa, MCF7 e HepG2 (Tabela 1.4).

Tabela 1.4: Valores de IC₅₀ (μM) obtidos ao tratar as linhas celulares HeLa, MCF7, MCF10 e HepG2 (cancro humano cervical, da mama, da mama epitelial e carcinoma do fígado hepatocelular, respetivamente) com os complexos [Ru(phpy)(bpy)(dppn)]⁺ [40], [Ru(phen)₂(dppz)](PF₆)₂ [39] e cisplatina.

t _{incubação}	Complexos	HeLa	MCF7	MCF10	HepG2
2h	[Ru(phpy)(bpy)(dppn)] ⁺ [40]	7 ± 1	-	-	-
	cisplatina [40]	40 ± 9	-	-	-
48h	[Ru(1-Py-βC)(DIP)](PF ₆) ₂ [39]	1,9 ± 0,2	5,9 ± 0,4	40,6 ± 3,1	3,5 ± 0,3
	cisplatina [39]	16,7 ± 2,5	35,2 ± 4,2	56,2 ± 5,9	20,2 ± 3,6

Neste caso a utilização da β -carbolina contribuiu para uma melhor penetração no núcleo e aumento da citotoxicidade por apoptose e autofagia. O mecanismo de apoptose foi associado à disfunção mitocondrial mediada por ROS. [39]

Do estudo realizado por Peña *et. al.* [40] surgiu também um complexo com potencial anticancerígeno. A citotoxicidade na linha celular HeLa do $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})(\text{dppn})]^+$ (phpy = 2-fenilpiridina desprotonada; bpy = 2,2'-bipiridina; dppn = benzo[i]dipirido-[3,2-a:2',3'-c]fenazina) foi também comparada com a da cisplatina, sendo o seu valor de IC_{50} 5,7 vezes inferior. Neste caso, o mecanismo de ação aparenta estar relacionado com as mitocôndrias. [40]

Outra característica de relevo relativamente aos complexos de ruténio com ligandos heterocíclicos aromáticos são as suas propriedades fotofísicas, nomeadamente a sua emissão de luminescência, tempo de vida e reatividade no estado excitado. [41] Um dos complexos mais estudados neste âmbito é o $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Este e os seus derivados têm sido muito estudados não só pelas suas propriedades fotofísicas, mas também pela sua estabilidade química e propriedades redox. [41], [42] Algumas das aplicações que estas características possibilitam incluem a sua utilização em materiais fotoreativos, utilização como biossensores, em fotossíntese artificial, fotocatalise, eletroquímica, fotoeletroquímica, transferência eletrónica em proteínas e DNA, e evidentemente em tratamentos quimioterapêuticos, sendo estes últimos o foco deste trabalho. [41], [43], [44] Adicionalmente, tirando partido da luminescência deste tipo de complexos, um desses tratamentos quimioterapêuticos poderá ser a terapia fotodinâmica, abordada na secção 6 deste trabalho.

1.3. Enquadramento do trabalho

Na sequência da investigação até agora desenvolvida pelo grupo de Química Organometálica do Centro de Química Estrutural da FCUL, este trabalho teve em vista a formulação de novos complexos de ruténio com várias propriedades favoráveis ao seu potencial uso como agente anticancerígeno, como as suas propriedades fotofísicas, a sua seletividade e capacidade de tirar partido do efeito EPR. Assim foram delineados os seguintes objetivos:

- 1) Síntese de um complexo de ruténio macromolecular funcionalizado com glucose para tirar partido do efeito de EPR e da sobreexpressão de recetores de glucose nas células tumorais; testar a influência deste fragmento na citotoxicidade;
- 2) Síntese de complexos de ruténio parentais do anterior para comparação em termos de citotoxicidade entre complexos de baixo e alto peso molecular e inclusão da biomolécula (glucose);

-
- 3) Caracterização dos complexos sintetizados pelas técnicas de Espetroscopia eletrônica, FTIR, Espetroscopia de Emissão, RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC) e Voltametria Cíclica.
 - 4) Ensaios de estabilidade para os complexos em diversos solventes, utilizando a técnica de Espetroscopia Eletrônica;
 - 5) Estudos de interação dos complexos com uma proteína transportadora do soro humano (albumina) por fluorescência.
 - 6) Ensaios biológicos nas linhas celulares A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, sensível à cisplatina), MCF7 (adenocarcinoma da mama humano, hormono-dependente) e fibroblastos (células não-tumorigênicas), para o estudo da citotoxicidade dos complexos.

Capítulo 2 - Síntese e caracterização dos macroligandos

2.1. Síntese dos macroligandos Bpy-PLA e Bpy-PLA-Gluc

O macroligando Bpy-PLA utilizado neste trabalho foi sintetizado de acordo com um procedimento desenvolvido anteriormente no grupo de investigação e semelhante ao descrito no relatório do projeto final de licenciatura de Adhan Pilon. [45]

2.1.1. Síntese do macroligando Bpy-PLA

Para esta síntese foram colocados num *Schlenk* em atmosfera inerte D,L-Lactídeo, 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina ($\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Figura 2.1). As proporções foram calculadas de modo a que houvesse 10 moléculas do monómero D,L-Lactídeo para cada braço da bipiridina.

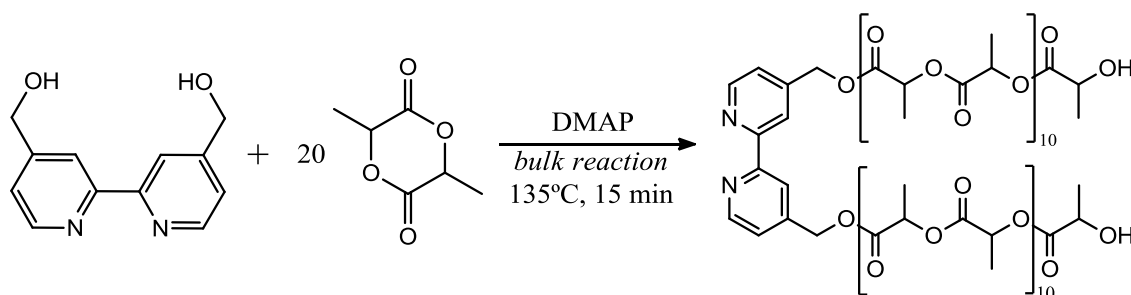


Figura 2.1: Esquema reacional da síntese do macroligando bpy-PLA.

Esta síntese envolve um catalisador nucleófilo, um álcool iniciador e um monómero. O ataque nucleofílico do catalisador DMAP ao monómero lactídeo causa a abertura do ciclo (Figura 2.2). Uma vez aberto, o iniciador $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ (representado por ROH na Figura 2.2; [46]) reage com o lactídeo ativado para formar um aducto, enquanto o nucleófilo DMAP é libertado simultaneamente. A propagação da cadeia polimérica dá-se de forma semelhante, por reação do grupo $-\text{OH}$ do aducto com o lactídeo ativado. Cada molécula de $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ origina duas cadeias poliméricas. No final do tempo de reação é provocado o *quench* da polimerização pela adição de água/metanol (1:1).

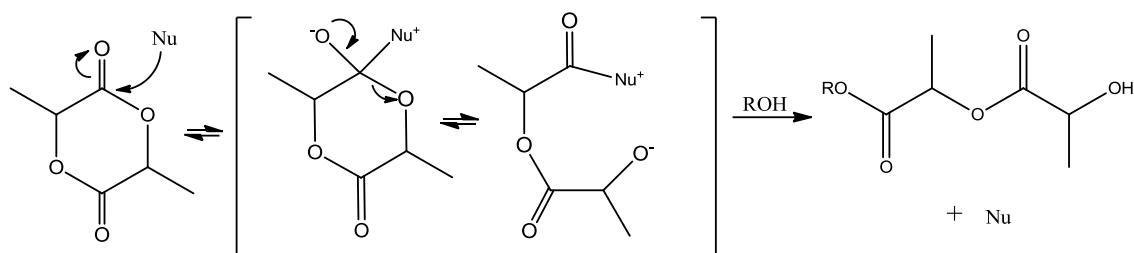


Figura 2.2: Mecanismo genérico da abertura do ciclo do D,L-Lactídeo usando um nucleófilo como catalisador e um álcool primário como iniciador da polimerização [46].

2.1.2. Síntese do macroligando Bpy-PLA-Gluc

Esta síntese consiste na funcionalização dos álcoois terminais do ligando bpy-PLA com ácido *D*-glucurónico (Gluc). Para isso o bpy-PLA previamente sintetizado é dissolvido em THF e de seguida são adicionados 2,5 equivalentes de TEA (triethylamina) para desprotonar os grupos álcool terminais das duas cadeias poliméricas. A solução fica em agitação durante 40 minutos sob fluxo de azoto, ao fim dos quais se adicionam 2,5 equivalentes de ácido *D*-glucurónico e se inicia o refluxo utilizando uma montagem de Dean-Stark. A reação só se dá por concluída após serem recolhidos 45 mL de solvente juntamente com a água que se forma durante a reação. O esquema da reação encontra-se na Figura 2.3.

É importante que a água seja removida do sistema à medida que se vai formando para prevenir a reversão da reação e, assim, maximizar a extensão da síntese. O mecanismo dessa reversão consiste num ataque nucleofílico da água (-OH) ao grupo carbonilo mais próximo do açúcar. Por este mesmo mecanismo a água pode também atacar um outro qualquer carbonilo das cadeias poliméricas, provocando a sua hidrólise.

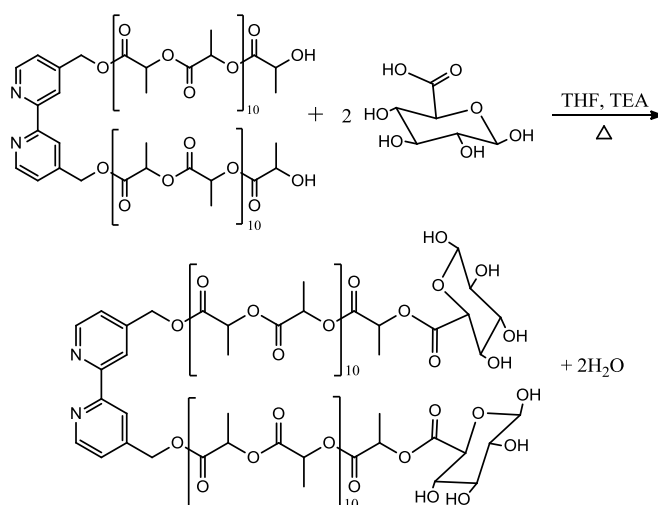


Figura 2.3: Esquema reacional da síntese do macroligando bpy-PLA-Gluc.

2.2. Caracterização dos macroligandos por RMN

Na Figura 2.4 está representada a estrutura do ligando bpy-PLA que foi caracterizado por RMN. Na Tabela 2.1 estão indicados os valores dos desvios químicos dos sinais dos prótons (em ppm, ou partes por milhão) e respectivas integrações, multiplicidades, constantes de acoplamento J (expressas em Hz), e atribuições destes sinais aos respectivos prótons (numerados na Figura 2.4). O espectro de ^1H -RMN pode ser consultado na Figura 2.5, onde são também identificados sinais atribuídos a solventes, de acordo com a bibliografia. [47]

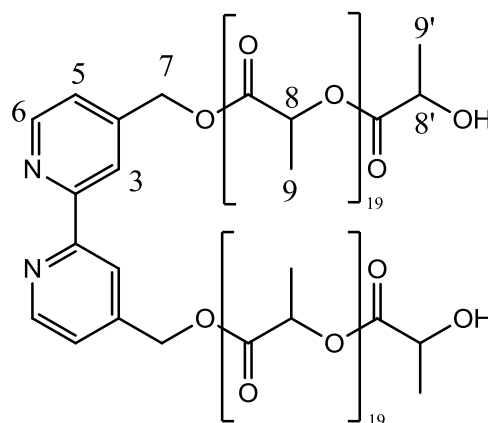


Figura 2.4: Estrutura do ligando bpy-PLA, de bipyridina com duas cadeias poliméricas de polilactídeo, com as numerações atribuídas aos prótons para a sua identificação nos espectros de RMN.

Tabela 2.1: Atribuição dos sinais de ^1H -RMN para o ligando bpy-PLA em acetonitrilo- d_3 , com os respectivos desvios químicos, integrações, multiplicidades e constantes de acoplamento.

Desvio ^1H (ppm)	Integração/ Multiplicidade	J (Hz)	Atribuição ^1H
8,658	2H/ d	4,8	H6
8,392	2H/ s	-	H3
7,361	2H/ d	4,4	H5
5,284	4H/ s	-	H7
5,151	40H/ m	-	H8
4,274	2H/ q	-	H8'
1,501	100H/ m	-	H9

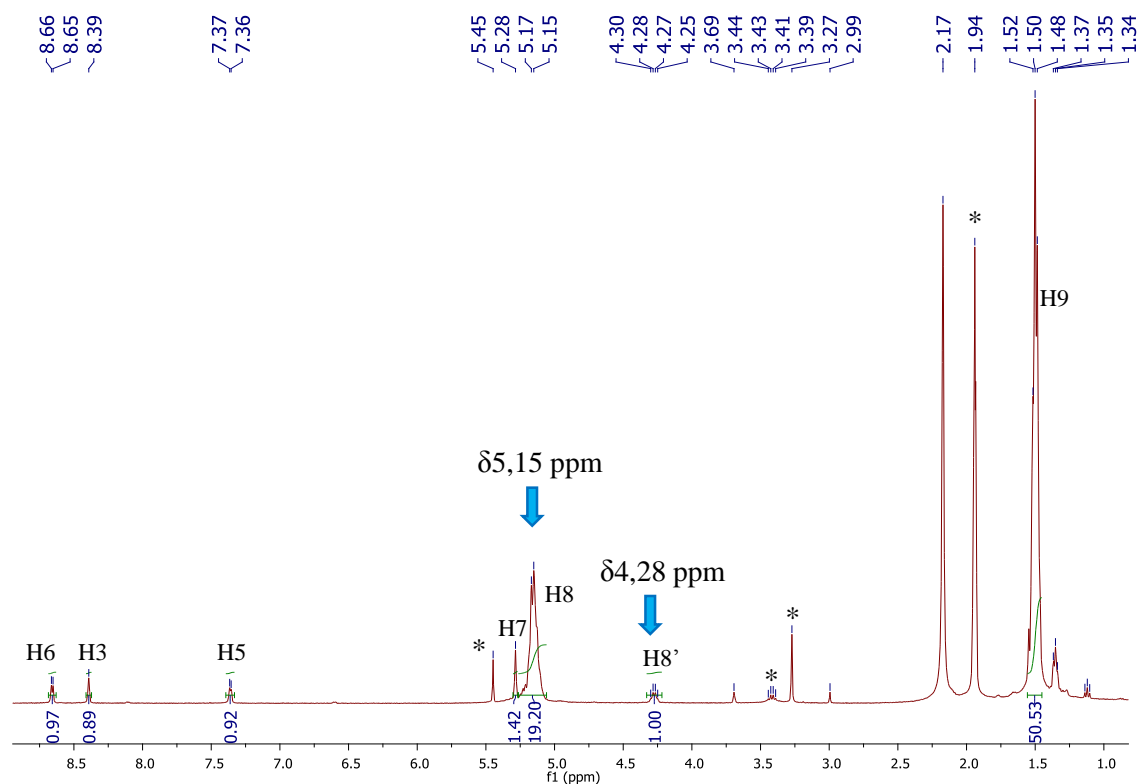


Figura 2.5: Espectro de ^1H -RMN do ligando bpy-PLA, em acetonitrilo- d_3 . Os sinais assinalados com * foram atribuídos a solventes: 5,45 ppm (diclorometano); 3,42 ppm (éter dietílico); 3,27 ppm (metanol); 1,94 ppm (acetonitrilo). [47]

Para efeitos de simplificação da análise do espectro de ^1H -RMN, esta foi feita tendo em consideração apenas metade da molécula. Isto significa que foi identificado o sinal do protão terminal da cadeia polimérica, e a sua integração foi normalizada para 1. Os valores das integrações de cada sinal representam assim metade do seu valor real.

Deste modo, é possível identificar os protões H3, H5 e H6 que, por serem aromáticos, se encontram entre 7,36 - 8,66 ppm. O singuleto a 8,39 ppm corresponde ao sinal do H3, o duplete a 7,37 ppm corresponde ao H5, e o duplete a 8,66 ppm ao H6 que, encontrando-se na vizinhança de um heteroátomo, está um pouco mais desblindado que o protão H5.

O multiplete a cerca de 5,15 ppm é o sinal atribuído aos protões da cadeia polimérica (H8), e o quarteto a 4,28 ppm é o sinal do protão terminal da cadeia polimérica (H8'). As integrações de ambos (19,20 e 1,00 respetivamente) foram utilizadas para o cálculo do grau de polimerização (DP_{exp} , equação 2.1), e indicam que se formaram duas cadeias poliméricas com cerca de 10 unidades de repetição cada, ligadas à bipyridina.

O grau de polimerização (DP_{exp}) é calculado com a equação 2.1, adaptada de Izunobi *et. al.* [48]. O valor de “a” equivale à integração dos sinais dos protões H8 a 5,15 ppm (19,20) e H8' a 4,28 ppm (1,00). O valor de “m” refere-se ao número de protões H8 e H8' (1 em ambos os casos), e o valor de “n” ao

número de vezes que estes prótons se repetem. A relação entre estes dois sinais fornece uma indicação da quantidade de repetições do monômero apenas numa das cadeias poliméricas ligadas à bipyridina.

No caso deste ligando, o valor de DP obtido para uma cadeia polimérica foi 19. Considerando ambas as cadeias poliméricas, este valor sobe para 38. Ou seja, uma vez que o valor obtido de DP equivale ao número de repetições do monômero na macromolécula pretendidos, este resultado indicia que a síntese foi bem-sucedida.

$$DP_{exp} = \left(\frac{a_{(H8)} m_{(H8')} n_{(H8')}}{a_{(H8')} m_{(H8)}} \right) \quad (2.1)$$

O valor do grau de polimerização DP é também importante no cálculo da massa molecular (M) do ligando (equação 2.2). Para obter o valor de M correspondente a toda a molécula, o DP usado tem que ser o total, neste caso 40, considerando o monômero representado fora de parêntesis retos, conforme representado na Figura 2.4. A massa molecular calculada para o ligando bpy-PLA é 3098,64 g/mol.

$$M_{(bpy-PLA)} = DP \times M_{monómero} + M_{bpy(CH_2OH)_2} \quad (2.2)$$

O conjunto de resultados obtidos, sendo eles o número de sinais atribuídos, os seus desvios químicos e as suas integrações, bem como o valor obtido nos cálculos do DP e massa molecular, sugerem que o ligando foi sintetizado com sucesso.

Nos cálculos de massa do macroligando bpy-PLA-Gluc foi subtraída a massa molecular das moléculas de água (subproduto da reação) e adicionada a massa dos fragmentos dos açúcares.

Na Figura 2.6 encontra-se a estrutura do ligando bpy-PLA-Gluc, numerada de forma semelhante à bpy-PLA. O seu espectro de próton pode ser consultado na Figura 2.7.

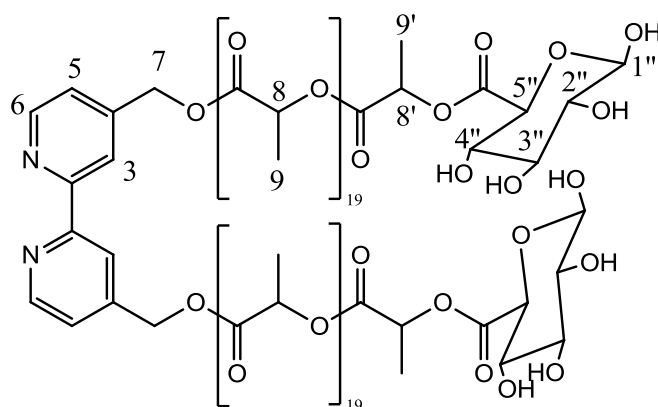


Figura 2.6: Estrutura do Ligando bpy-PLA-Gluc, de bipyridina com duas cadeias poliméricas de polilactídeo, com as numerações atribuídas aos prótons para a sua identificação nos espectros de RMN.

Uma comparação direta entre o espectro deste ligando e o do ligando anterior não é possível, uma vez terem sido feitos em solventes diferentes. Não obstante, os espectros são semelhantes e foi possível fazer a análise da mesma forma: entre os sinais a 8,77 ppm e a 4,36 ppm os sinais podem ser atribuídos aos prótons análogos da bpy-PLA (Tabela 2.2). Na zona do espectro de menores desvios químicos é bastante difícil identificar os sinais, uma vez que o espectro está mal resolvido. Observa-se também um sinal intenso de água que pode estar sobreposto ou a mascarar outros sinais. Foram feitos estudos para confirmar a presença do fragmento do ácido *D*-glucurónico no complexo F02, discutidos nas páginas 26 e 27.

A massa molecular do ligando bpy-PLA-Gluc foi calculada de forma semelhante ao ligando bpy-PLA: depois de calculada $M_{\text{bpy-PLA}}$, adicionou-se a esse valor a massa molecular de duas moléculas de ácido *D*-glucurónico. O valor resultante é 3415,06 g/mol.

Tabela 2.2: Atribuição dos sinais de ^1H -RMN para o ligando bpy-PLA-Gluc em clorofórmio-d, com os respetivos desvios químicos, integrações e multiplicidade.

Sinal ^1H (ppm)	Integração/ Multiplicidade	Atribuição ^1H
8,768	2H/ s	H6
8,612	2H/ s	H3
7,442	2H/ s	H5
5,338	4H/ s	H7
5,165	40H/ m	H8
4,357	2H/ m	H8'

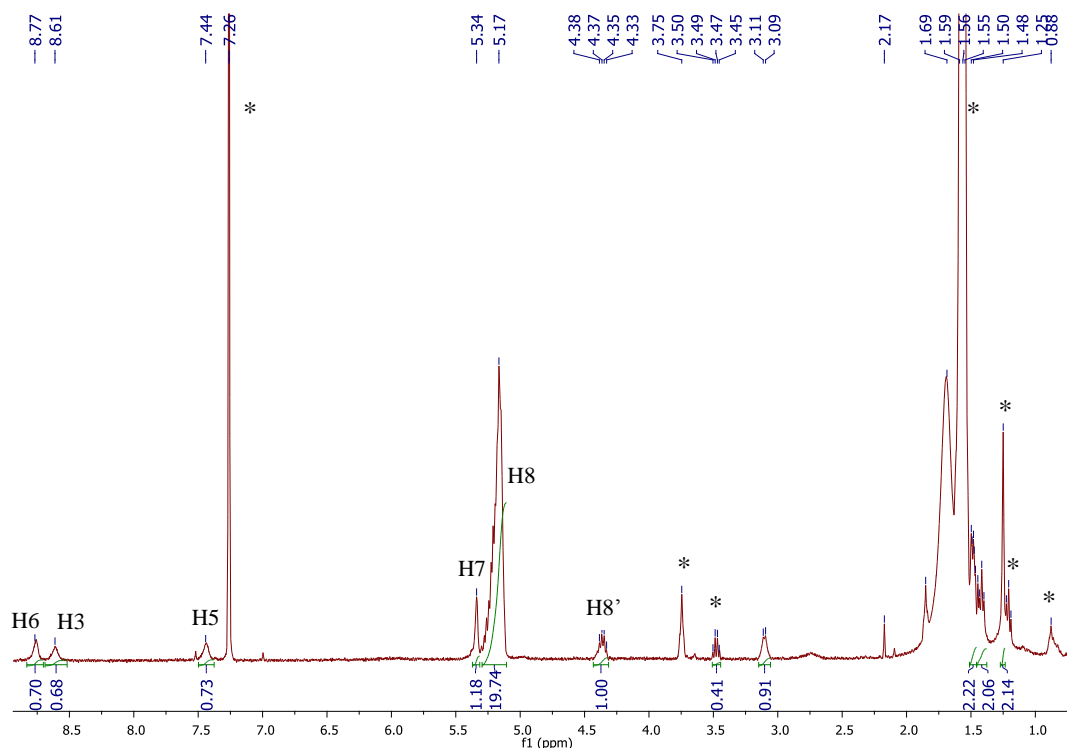


Figura 2.7: Espectro de ^1H -RMN do ligando bpy-PLA-Gluc, em clorofórmio-d. Os sinais assinalados com * foram atribuídos a solventes: 7,26 ppm (CDCl_3); 3,75 ppm (THF); 3,49 ppm (éter dietílico); 1,56 ppm (H_2O); 1,21 ppm (éter dietílico); 1,25 e 0,88 ppm (grease). [47]

Capítulo 3 - Síntese e caracterização dos complexos de Rutênio (II)

3.1. Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$

Na síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (F01), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (F02) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (F03), cujas estruturas se encontram representadas na Figura 3.1, foi utilizado o complexo precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$, sintetizado com base no trabalho de Sullivan *et. al.* [49] e usando modificações previamente introduzidas no âmbito da Tese de Mestrado de Ana Sofia Assis [50].

Os três complexos foram sintetizados através do mesmo método: o complexo precursor é dissolvido em acetona em atmosfera inerte e protegido da luz, e de seguida adiciona-se trifluorometanosulfato de prata AgCF_3SO_3 . Deixa-se a solução em agitação durante 30 minutos a uma hora, à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo adiciona-se (consoante o complexo desejado) o ligando bpy-PLA (F01), bpy-PLA-Gluc (F02) ou $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ (F03). As quantidades de precursor, ligando e AgCF_3SO_3 a adicionar foram calculadas para estarem nas seguintes proporções 1,2:1:2,4. Após a última adição é iniciado o refluxo. A reação é controlada por TLC e dura em média 4 horas.

Na Figura 3.1 encontram-se as estruturas dos complexos F01, F02 e F03, cuja fórmula geral é $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-R})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, onde bpy-R é uma bipyridina funcionalizada.

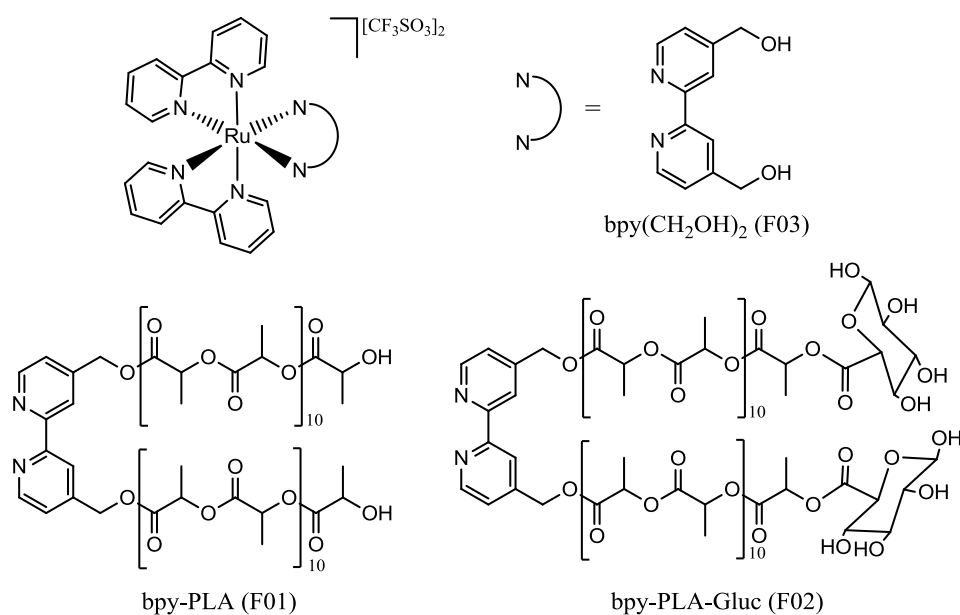


Figura 3.1: Estruturas dos complexos F01, F02 e F03.

Os valores obtidos nos ensaios de análise elementar para o composto F03 (Tabela 3.1) mostram que este ainda contém uma pequena percentagem de impurezas. As discrepâncias entre os valores calculados e os obtidos podem-se dever a pequenas quantidades de solvente ainda presentes, como diclorometano (usado no processo de purificação), ou de sal de prata. Cálculos adicionais assumindo que a impureza se trata de diclorometano revelaram que esta é uma possibilidade plausível.

Tabela 3.1: Valores calculados e obtidos em análise elementar do complexo F03.

	%C	%H	%N	%S
Calculado	44,0	3,04	9,06	6,91
Obtido	40,4	3,10	7,70	7,00
Cálculo teórico com impureza (F03 · 0.1CH ₂ Cl ₂)	40,4	2,96	7,96	6,08

3.2. Caracterização dos complexos [Ru(bpy)₂{bpy(CH₂OH)₂}] [CF₃SO₃]₂, [Ru(bpy)₂(bpy-PLA)] [CF₃SO₃]₂ e [Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)] [CF₃SO₃]₂

3.2.1. Caracterização por RMN

A caracterização por RMN dos três complexos foi feita por análise de espectros 1D ¹H-RMN e ¹³C-RMN, e de espectros 2D COSY, HSQC e HMBC.

Caracterização do complexo F03, [Ru(bpy)₂(bpy(CH₂OH)₂)] [CF₃SO₃]₂

O complexo F03 é o que tem a estrutura mais simples. A numeração dos seus prótons e carbonos foi feita de acordo com a Figura 3.2 e os espectros de carbono e 2D (HMBC e HSQC) podem ser consultados em anexo (Anexo 4 a Anexo 7). As atribuições dos sinais aos seus prótons (Figura 3.3) e aos sinais do espectro de carbono estão reunidos na Tabela 3.2.

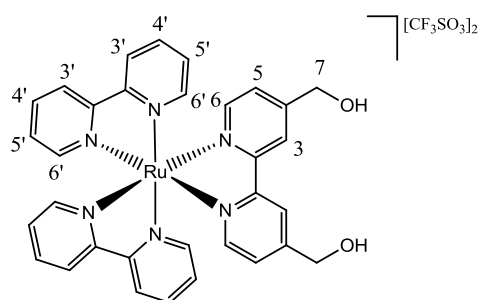


Figura 3.2: Complexo [Ru(bpy)₂(bpy(CH₂OH)₂)] [CF₃SO₃]₂, também denominado por F03, com as numerações atribuídas aos prótons para a sua identificação nos espectros de RMN.

Tabela 3.2: Tabela das atribuições dos sinais de ^1H -RMN para o complexo F03 em DMSO- d_6 (Figura 3.3), com os respectivos desvios químicos, atribuições aos sinais de ^{13}C -RMN, integrações, multiplicidades e constantes de acoplamento.

Desvios ^1H (ppm)	Integração/ Multiplicidade	J (Hz)	Atribuição ^1H	Sinal ^{13}C (ppm) correspondente	Atribuição ^{13}C
8,841	4H/ d	8,0	H3'	124,9	C3
8,703	2H/ s	-	H3	122,0	C3'
8,163	4H/ t	7,8	H4'	138,2	C4'
7,747	4H/ t	4,4	H6'	151,5+151,1 ?	C6'
7,658	2H/ d	5,6	H6	151,6 ?	C6
7,530	4H/ t	6,6	H5'	128,3	C5'
7,467	2H/ d	5,6	H5	151,5?	C5
4,741	4H/ s	-	H7	61,3	C7

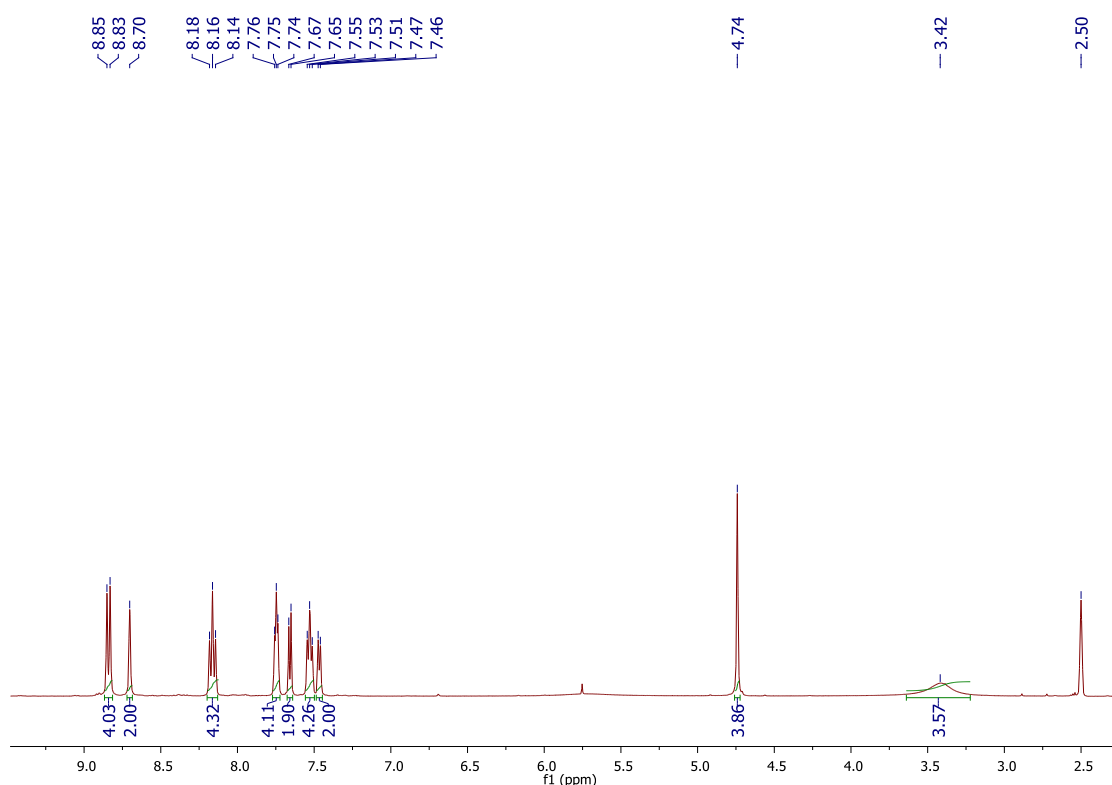


Figura 3.3: Espectro de ^1H -RMN do complexo F03, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em DMSO- d_6 .

Na Figura 3.4, que apresenta a sobreposição dos espectros de próton do complexo F03 com o seu ligando livre $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$, pode observar-se que os sinais dos prótons aromáticos sofreram alterações nos seus desvios químicos. Mais especificamente, o próton H6, que se é o mais próximo do heteroátomo, sofreu uma blindagem de 0,9 ppm que pode ser devida à retrodoação π do metal. Os prótons H3 e H5 do ligando sofreram uma desblindagem pouco significativa de 0,3 e 0,1 ppm, respetivamente. Verifica-

se também a desblindagem do próton H7, com uma variação de 0,1 ppm. Estas diferenças indicam que houve coordenação da $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ ao centro metálico (Figura 3.5).

Ligando $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$

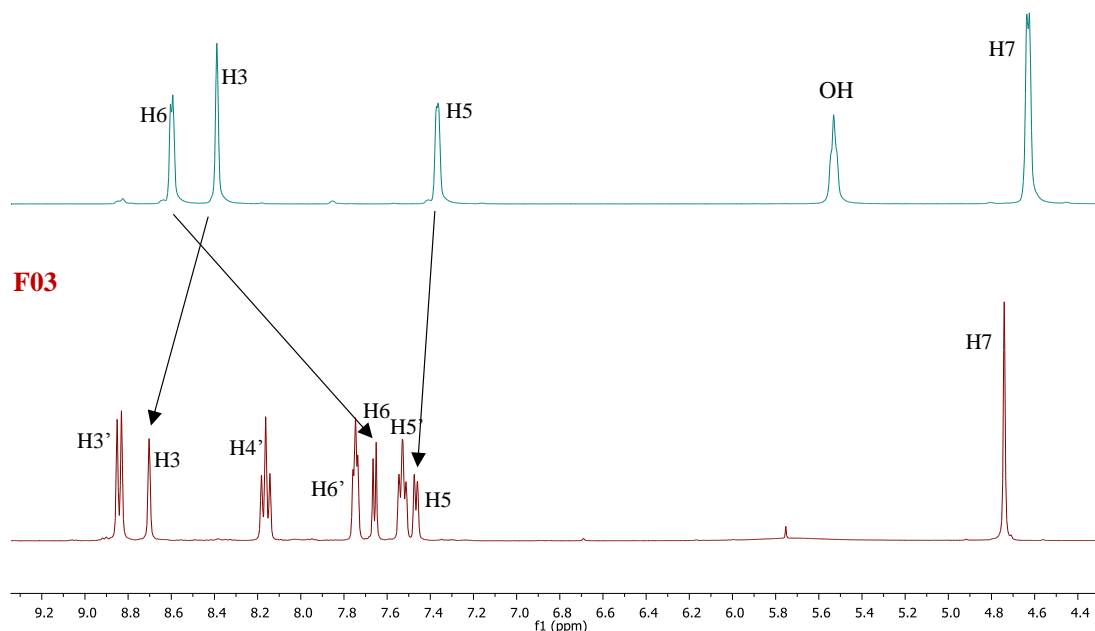


Figura 3.4: Sobreposição dos espectros de ^1H -RMN do complexo F03 e do ligando $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$, em $\text{DMSO}-d_6$.

Na Figura 3.6 são comparados os espectros de próton do complexo F03 com o do complexo precursor $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$. Verifica-se que o próton H6b é o mais desblindado, a 9,97 ppm. Todavia, verifica-se que após a substituição dos íons cloreto pelo ligando $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$, este próton sofre uma grande blindagem ($\Delta\delta = 2,21$ ppm) devido ao seu posicionamento espacial no cone de blindagem da bipyridina vizinha (efeito de anisotropia). Os prótons H5b também são blindados, mas apenas por 0,24 ppm. Todos os outros prótons sofrem uma pequena desblindagem.

É também de notar que, se por um lado no complexo precursor cada anel piridínico (da mesma bipyridina) contém prótons magneticamente diferentes (ex: $\text{H3a} \neq \text{H3b}$), o mesmo não acontece nas

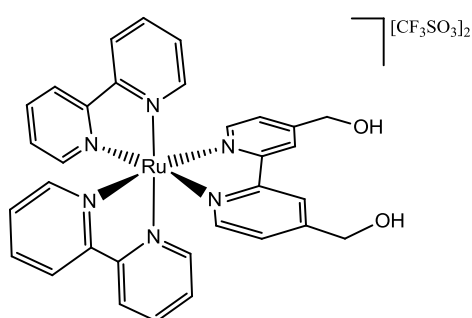


Figura 3.5: Complexo F03, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.

bipyridinas do complexo F03. Este efeito também se deve à substituição dos íons cloreto por uma bipyridina funcionalizada, após a qual todos os prótons com o mesmo número passam a ter vizinhanças semelhantes.

Na Figura 3.5 encontra-se a estrutura tridimensional proposta para o complexo F03, também semelhante à dos outros complexos estudados ao longo deste trabalho. Esta conformação espacial foi já proposta em trabalhos anteriores. [51] [52]

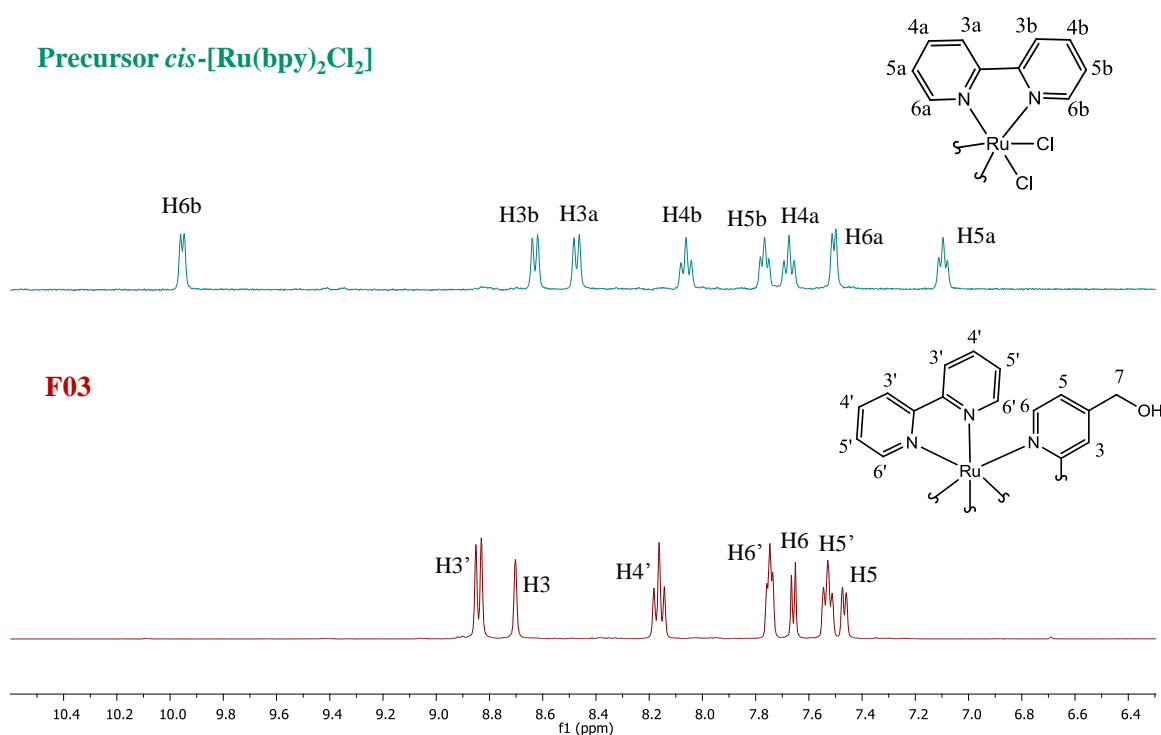


Figura 3.6: Sobreposição dos espectros de próton do complexo precursor [Ru(bpy)₂Cl₂] com o complexo F03 [Ru(bpy)₂bpy(MeOH)₂][CF₃SO₃]₂ em DMSO-d₆.

Caracterização do complexo F01, [Ru(bpy)₂(bpy-PLA)][CF₃SO₃]₂

Na Figura 3.7 está representada a estrutura do complexo F01. Na Tabela 3.3 estão explícitos os valores dos desvios (em ppm) dos sinais dos prótons e respectivas integrações, multiplicidades, e atribuições aos respectivos prótons (numerados também na Figura 3.7). O espectro de próton pode ser consultado no Anexo 2.

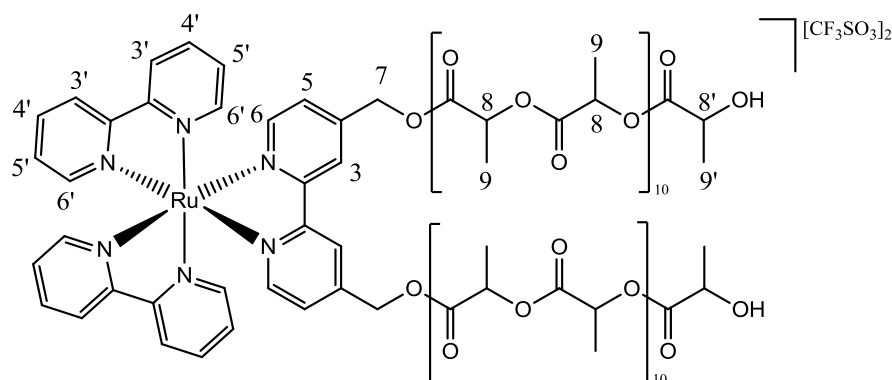


Figura 3.7: Complexo [Ru(bpy)₂(bpy-PLA)][CF₃SO₃]₂, também denominado por F01, com as numerações atribuídas aos prótons para a sua identificação nos espectros de RMN.

Tabela 3.3: Atribuição dos sinais de ^1H -RMN para o complexo F01 em clorofórmio-d, com os respectivos desvios químicos, atribuições aos sinais de ^{13}C -RMN, integrações e multiplicidade, em clorofórmio-d.

Desvio ^1H (ppm)	Integração/ Multiplicidade	Atribuição ^1H	Sinal ^{13}C (ppm) correspondente	Atribuição ^{13}C
8,482	6H/ comp	H3 + H3'	122,3/124,4	C3/C3'
8,026	4H/ t	H4'	138,2	C4'
7,799	2H/ s	H6' (2H)	151,7	C6'
7,740	4H/ comp	H6 + H6' (2H)	151,7/151,7	C6/C6'
7,497	4H/ m	H5'	128,3	C5'
7,395	2H/ m	H5	125,9	C5
5,381	4H/ m	H7	64,3	C7
5,146	40H/ m	H8	69,1	C8
4,358	2H/ m	H8'	66,8	C8
1,555	120H/ m	H9	16,8	C9

No caso deste complexo, tal como no seguinte, a fraca intensidade dos sinais dos carbonos e/ou a sobreposição de sinais de prótons quimicamente diferentes na zona dos aromáticos dificultou a identificação dos sinais dos carbonos, podendo assim surgir sinais com atribuições incertas.

Tal como foi feito para os macroligandos, a integração do sinal dos prótons terminais das cadeias poliméricas foi normalizado para 1, o que significa que os valores das integrações têm apenas em consideração metade da molécula. Este sinal encontra-se ao desvio químico de 4,36 ppm e corresponde aos prótons terminais das cadeias poliméricas.

De forma semelhante ao complexo F03, é possível observar entre 7,40 e 8,48 ppm o conjunto de sinais corresponde aos prótons aromáticos. A diferença surge na presença dos sinais característicos do macroligando bpy-PLA (H7, H8, H8' e H9).

A sobreposição dos espectros de ^1H -RMN (em acetone-nitrolo- d_3) do complexo F01 com o do seu ligando livre bpy-PLA (Anexo 8) revelam que, após a síntese, ocorre a blindagem dos prótons H3 ($\Delta\delta = 0,1$ ppm) e a desblindagem dos prótons H6 ($\Delta\delta = 0,7$ ppm). O desvio químico de H5 não varia significativamente e as diferenças nos desvios de H3 e H6 são inferiores às que ocorreram no complexo F03. Os sinais dos polímeros mantiveram-se inalterados após a síntese.

A presença de todos os sinais esperados no espectro de próton, bem como as diferenças de desvios químicos detetadas face ao ligando livre e ao complexo precursor confirmam que o complexo F01 foi sintetizado com sucesso.

Caracterização do complexo F02, [Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)][CF₃SO₃]₂

O complexo F02 difere do F01 somente no ligando que contém as cadeias poliméricas que, no caso do F02, se encontram funcionalizadas com ácido *D*-glucurônico, que poderá também ser referido como açúcar.

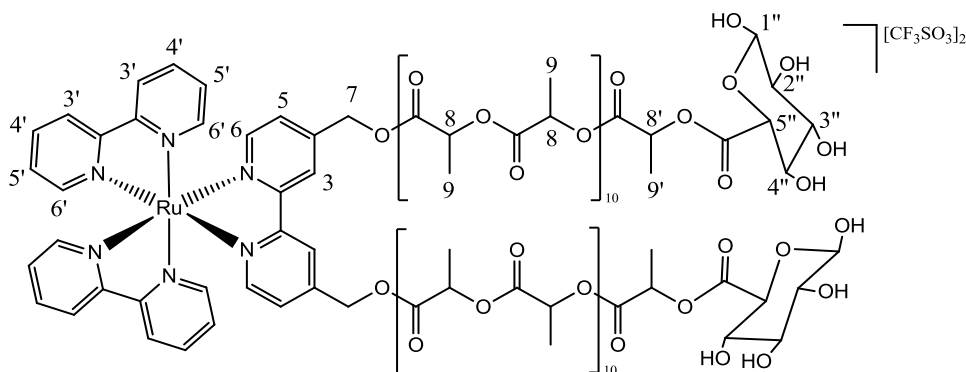


Figura 3.8: Complexo [Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)][CF₃SO₃]₂, também denominado por F02, com as numerações atribuídas aos prótons para a sua identificação nos espectros de RMN.

O espectro de próton pode ser consultado no Anexo 3. Na Tabela 3.4 estão listados os desvios químicos (em ppm) dos sinais dos prótons e respectivas integrações, multiplicidades, e atribuições aos respectivos prótons (numerados na Figura 3.8).

Tabela 3.4: Atribuição dos sinais de ¹H-RMN para o complexo F02 em clorofórmio-d, com os respectivos desvios químicos, atribuições aos sinais de ¹³C-RMN, integrações e multiplicidade, em clorofórmio-d.

Desvios ¹ H (ppm)	Integração/ Multiplicidade	Atribuição ¹ H	Sinal ¹³ C (ppm) correspondente	Atribuição ¹³ C
8,504	6H/ comp	H3 + H3'	122,3/124,4	C3 + C3'
8,028	4H/ t	H4'	138,2	C4'
7,783	2H/ s	H6' (2H)	151,6	C6'
7,724	4H/ comp	H6 + H6' (2H)	151,6	C6 + C6'
7,510	4H/ t	H5'	128,4	C5'
7,392	2H/ m	H5	128,5	C5
5,382	4H/ m	H7	64,3 ?	C7
5,150	40H/ m	H8	69,1	C8
4,346	2H/ q	H8'	66,8	C8'
1,551	120H/ m	H9	16,8	C9

Na Figura 3.9, que compara os espectros dos complexos F01 e F02, é possível verificar que, no geral, não há diferenças visíveis nos desvios químicos dos sinais que correspondem aos fragmentos comuns a ambos os compostos, como era esperado. Relativamente ao ligando livre bpy-PLA-Gluc também se observa que o sinal do seu protão H6 é o que apresenta maior variação de desvio químico, sofrendo uma blindagem de $\Delta\delta = 1,0$ ppm. O protão H3 sofreu uma pequena blindagem de 0,1 ppm e tanto o H5 como o H7 não sofrem alterações significativas (Anexo 9).

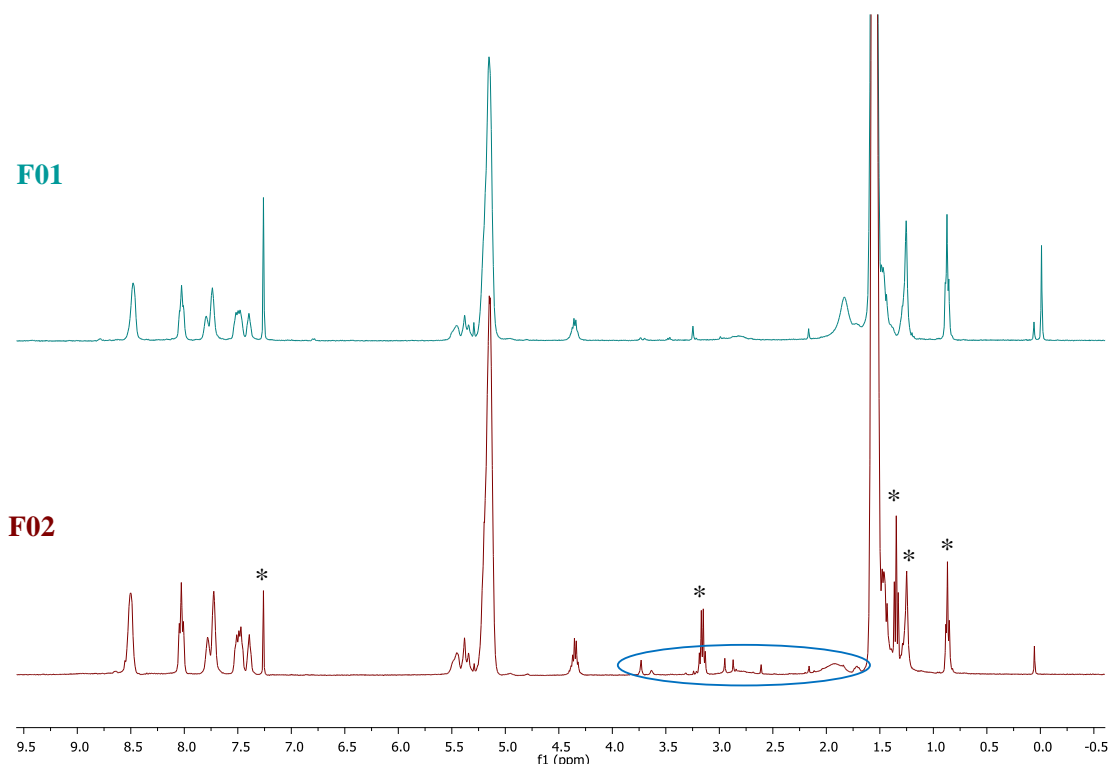


Figura 3.9: Espectros de ^1H -RMN dos complexos F01 e F02, em clorofórmio-d. * sinais atribuídos a solventes: 7,26 ppm corresponde ao CDCl_3 ; 3,16 e 1,35 correspondem a éter dietílico; 1,25 e 0,86 ppm correspondem a n-hexano. [47]

A única diferença relevante são os sinais que surgem na zona destacada na figura. Devido à fraca intensidade destes sinais, e ao facto de se poderem encontrar desdobrados, não foi possível interpretá-los através dos espectros 2D. Não obstante, é comum os sinais dos protões dos grupos $-\text{CH}$ e $-\text{OH}$ dos açúcares surgirem na zona indicada no espectro. [53]

Foi realizado um estudo de RMN no qual se usou o solvente $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. No decorrer desse estudo foram adicionadas gotas e D_2O aos tubos de RMN e aumentou-se também a temperatura.

O estudo com $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (Figura 3.10) revelou um outro sinal de protão do açúcar a 4,21 ppm (circulo azul) após adição de D_2O e aumento da temperatura para 44°C . Para confirmar que se trata de um desdobramento, foram comparados os valores de integração destes sinais relativamente aos sinais a cerca de 7,6 ppm (seta azul) e 5,2 ppm (seta laranja), estando os valores reunidos na Tabela 3.5.

Como a soma das integrações dos sinais circundados a azul no espectro A (Figura 3.10) não resultam no mesmo valor de integração do sinal no espectro B, conclui-se que não ocorreu desdobramento deste último, e que é de facto detetado um novo sinal, que pode pertencer aos açúcares.

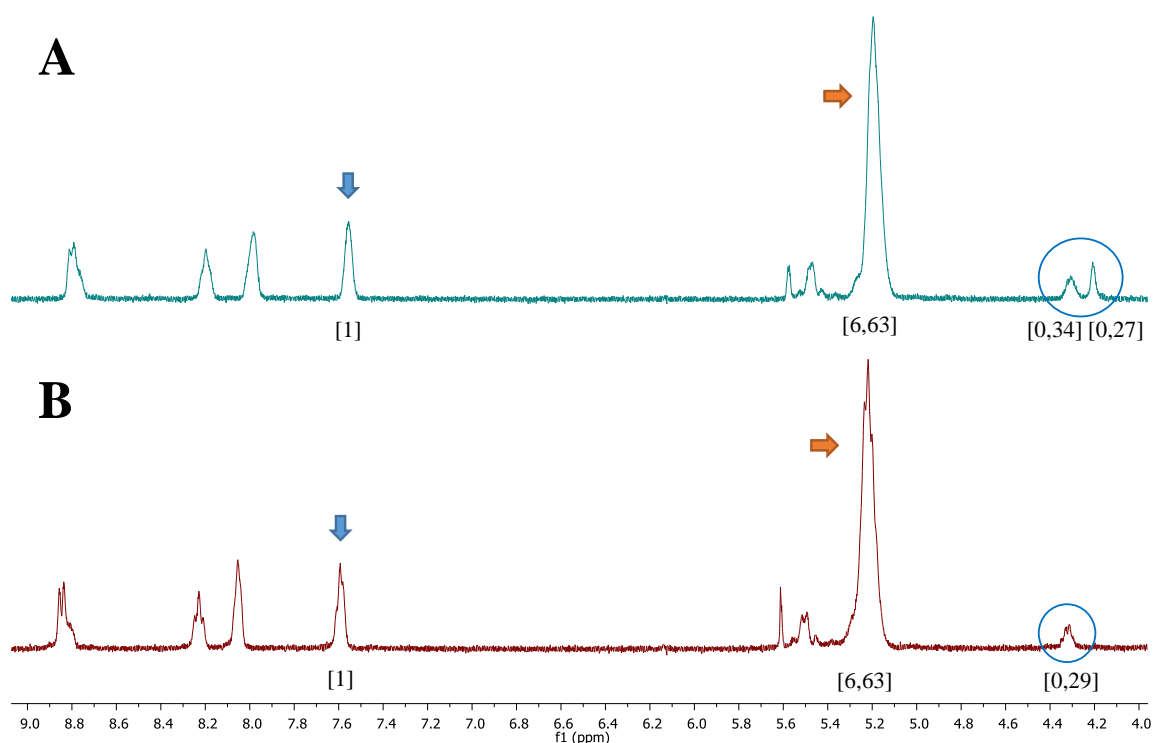


Figura 3.10: Espectro de ^1H -RMN do complexo F02 em acetona- d_6 seca a cerca de 44°C . O espectro A foi feito após adição de algumas gotas de D_2O . O espectro B pertence à mesma amostra, mas foi feito antes da adição de D_2O . Os valores entre parênteses retos correspondem às integrações dos sinais acima deles.

Tabela 3.5: Valor da integração dos sinais de interesse nos espectros de ^1H -RMN no estudo do complexo F02 antes e após adição de D_2O (referente à Figura 3.10).

	Integrações (δ /ppm)		
c/ D_2O	1 (7,55)	6,64 (5,29 – 5,10)	0,34 (4,32); 0,27 (4,21)
s/ D_2O	1 (7,59)	6,63 (5,34 – 5,12)	0,29 (4,32)

De futuro poder-se-á repetir estes ensaios com DMSO-d_6 para tentar reproduzir os resultados obtidos por Yasugi *et. al.* [53] Seria também relevante realizar ensaios de espectroscopia de massa (MALDI-TOF) para confirmar, em conjunto com RMN, se a maioria das moléculas do complexo F02 foram funcionalizadas com 2 moléculas de ácido *D*-glucurónico.

3.2.2. Caracterização por UV-Vis

A técnica de espectroscopia eletrônica, conhecida mais simplesmente por UV-Vis, é uma técnica de simples utilização e é uma ferramenta essencial para a caracterização de complexos de coordenação. Os espectros dos complexos F01 a F03 foram obtidos em dois solventes orgânicos (DCM, DMSO) e em solução aquosa (HEPES e meio de cultura celular DMEM) entre o *cut-off* do solvente e 900 nm, à temperatura ambiente, em soluções de concentrações entre $9,5 \times 10^{-6}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ M. A baixa solubilidade dos complexos em meio aquoso tornou necessária a adição de uma pequena quantidade de DMSO como co-solvente (2-5% v/v). O DCM e o DMSO foram escolhidos por terem índices de polaridade distintos (3,1 e 7,2 respetivamente) [54] de forma a observar solvatocroísmo.

Na Figura 3.11 pode consultar-se o espectro eletrónico do complexo F01 em DCM e DMSO. Nele pode-se verificar a presença de uma banda com ombro a cerca de 250 nm, uma banda muito intensa a cerca de 290 nm e uma outra banda com ombro a cerca de 455 nm. Os espectros obtidos para os compostos F02 e F03 são muito semelhantes aos do F01, como esperado, e portanto F01 tipifica o comportamento observado em todos os complexos. No Anexo 10 estão discriminados os comprimentos de onda máximos das bandas e ombros observados nos espectros, bem como respetivos valores de absorvidade molar.

Verifica-se que a banda entre 270 e 310 nm (Figura 3.11) é a que sofre a maior alteração com a alteração do solvente. Esta pode assim corresponder a uma ILCT (transferência de carga intraligando) $\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*$. Quando se passa de um solvente mais apolar (DCM) para um mais polar (DMSO), observa-se um desvio batocrómico da referida banda (~ 290 nm), ou seja um desvio para comprimentos de onda maiores. No estado excitado a polaridade do solvente pode ter um efeito estabilizador do sistema (interações dipolo-dipolo), diminuindo a diferença de energia entre esse estado, e o estado fundamental. [55]

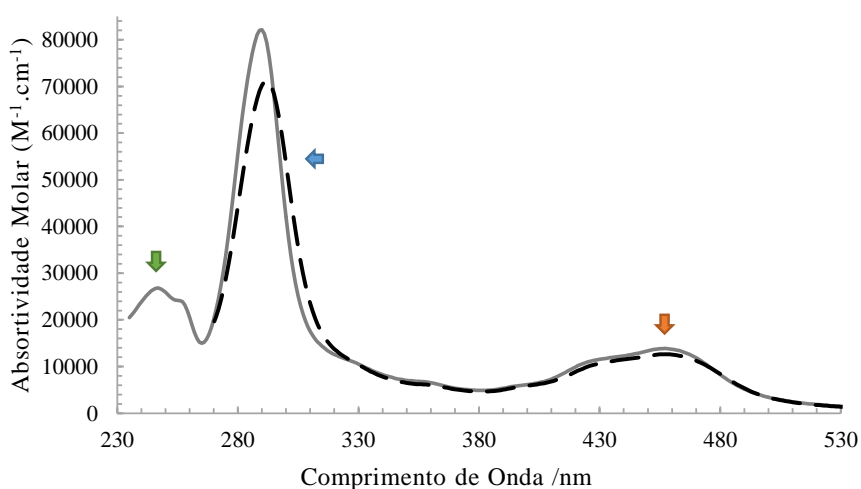


Figura 3.11: Espectros eletrônicos do complexo F01 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DCM (linha sólida) e DMSO (tracejado). As setas indicam as principais bandas identificadas: MLCT a 456 nm (laranja); transferência ILCT $\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*$ a 289-292 nm (azul); transições intraligando $\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*$ a 246/247 nm (verde).

As bandas MLCT ($d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$) surgem a 456 nm. O ombro desta banda pode ser atribuído a uma segunda transição MLCT [56] ou à sobreposição com uma banda d-d. O *cut off* do DCM [57] permite observar uma janela de comprimentos de onda um pouco maior que a do DMSO, revelando um máximo a 246/247 nm com um ombro. Estas bandas podem ser atribuídas a transições intraligando

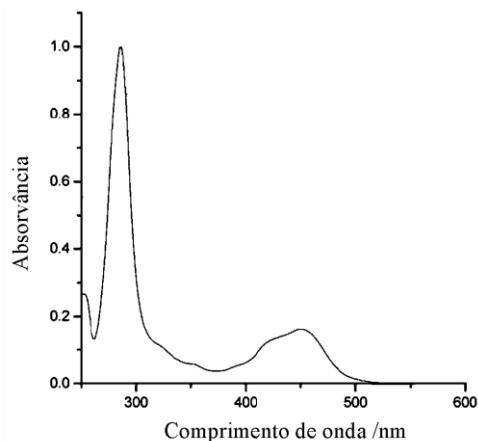


Figura 3.12: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em acetonitrilo, em que o máximo de absorção da banda de MLCT se encontra a 449 nm. Adaptado de Zhou *et. al.* [60]

$\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*$. [49] Como o complexo F03 não tem polímero e ainda assim apresenta bandas a 256 nm e 246 nm, confirma-se que estas correspondem a transferências eletrônicas referentes às bipyridinas coordenadas.

As bandas de transição $n \rightarrow \pi^*$ correspondentes aos grupos carbonilo por norma encontram-se entre 280-300 nm [58] o que significa que são ofuscadas pelas intensas bandas das bipyridinas. Isto impossibilita a sua identificação inequívoca.

Todas as atribuições efectuadas podem ser corroboradas por trabalhos anteriores com complexos de ruténio contendo bpy como ligando. [56], [58], [59] Por comparação com o espectro obtido por Zhou *et. al.* [60] para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em acetonitrilo (índice de polaridade 5,8) podem observar-se as mesmas bandas de absorção obtidas para os complexos em estudo, o que reforça a atribuição das mesmas a processos de transferência de carga que ocorrem entre o metal e as bipyridinas, e as que ocorrem dentro de cada sistema aromático das bipyridinas.

3.2.3. Caracterização por FTIR

A informação que se retira dos espectros de FTIR complementa a caracterização dos compostos sintetizados, uma vez que as bandas que aparecem nestes espectros são indicativas da presença de grupos funcionais presentes na amostra. A presença de certos grupos-chave pode confirmar a presença do complexo pretendido na amostra sólida.

No Anexo 11 encontram-se as principais atribuições de bandas dos espectros de FTIR dos 3 complexos, cujos espectros dos complexos F01 e F03 podem ser consultados na Figura 3.13.

São visíveis algumas bandas comuns a todos os complexos, como $\nu(\text{C-N})$ correspondente a aminas aromáticas. Esta surge a cerca de 1276 cm^{-1} , e pode estar sobreposta à banda característica do contra-íão CF_3SO_3^- .

É notória a ausência da banda intensa a cerca de 1753 cm^{-1} no espectro do complexo F03. Esta banda corresponde aos estiramentos $\nu(\text{C=O})$ e $\nu(\text{C-O})$ que ocorrem nos fragmentos de polímero, sendo assim apenas visíveis nos espectros de F01, F02, e ácido *D*-glucurônico.

Os espectros dos mencionados complexos são muito semelhantes, e como tal não foi possível identificar inequivocamente bandas pertencentes aos fragmentos de glucose. Ainda assim, é possível deduzir que o complexo F02 foi sintetizado, como pretendido, pela caracterização por RMN (secção 3.2.1). A diferença entre os dois compostos reflete-se também nos ensaios de viabilidade celular, que são apresentados na secção 4.2.

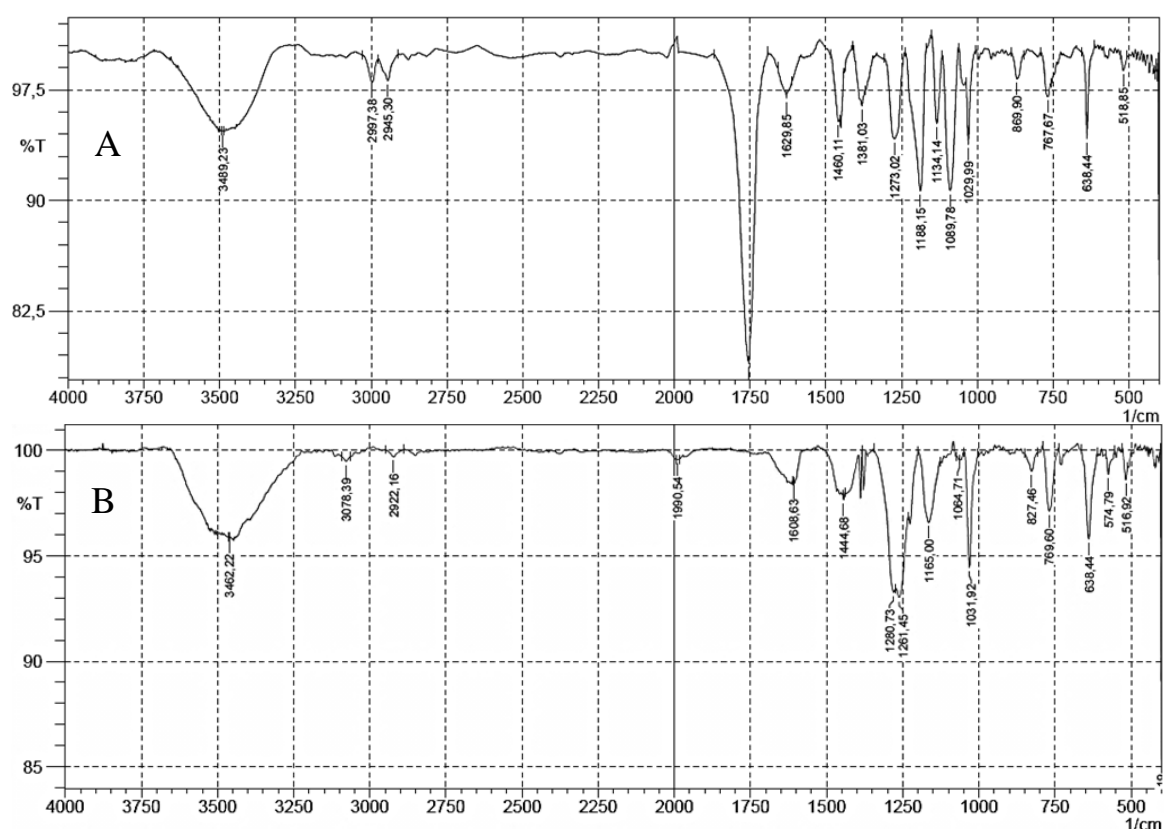


Figura 3.13: Espectro de FTIR de A) do complexo F01, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ e B) Espectro de FTIR do complexo F03, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.

3.2.4. Caracterização por Espectroscopia de Emissão (fluorescência/fosforescência)

Os complexos de rutênio obtidos foram caracterizados em solução por espectroscopia de emissão à temperatura ambiente. Prepararam-se soluções com 2,5 a 10 μM dos compostos em vários solventes (Tabela 3.6). O comprimento de onda de excitação de 455 nm foi escolhido por estar muito próximo do máximo de absorvância da banda de MLCT registrada por UV-Vis para todos os complexos (Anexo 10). Foram obtidos espectros de emissão entre 310 e 650 nm, variando o comprimento de onda de excitação (Tabela 3.6), tendo-se verificado que, para todos os complexos num determinado solvente, o λ de emissão é sempre o mesmo independente do λ de excitação. Verificou-se que todos os complexos são luminescentes em meio aquoso. Os complexos emitem entre ~ 525 nm e ~ 750 nm, com os máximos de intensidade entre o 608 e o 639 nm dependendo do solvente. A Figura 3.14A reúne os espectros de emissão obtidos para os complexos F01, F02 e F03 em DMSO(2%)/HEPES (concentrações de 4.9, 4.4 e 5.2 μM respetivamente; $\lambda_{\text{exc}} = 455/460$ nm; $T = 25,0 \pm 0,1$ °C), entre 500 e 650 nm (o limite superior de varrimento possível no detetor do equipamento utilizado). Os espectros de emissão em DCM e ACN para cada um dos complexos estão reunidos no Anexo 17.

Usando a espectroscopia de emissão resolvida no tempo determinou-se o tempo de vida médio do estado excitado para cada um dos complexos em DMSO(2%)/HEPES, através do ajuste de decaimentos como o apresentado na Figura 3.14B, que usa o complexo F01 como exemplo. Desta figura pode concluir-se pela escala de tempo utilizada (ns) que o tempo de vida do estado excitado é bastante longo, o que se pode confirmar na Tabela 3.6, que reúne os valores de tempo de vida médio do estado excitado (τ_0) obtidos, bem como os valores de λ_{em} máximos observados em cada solvente.

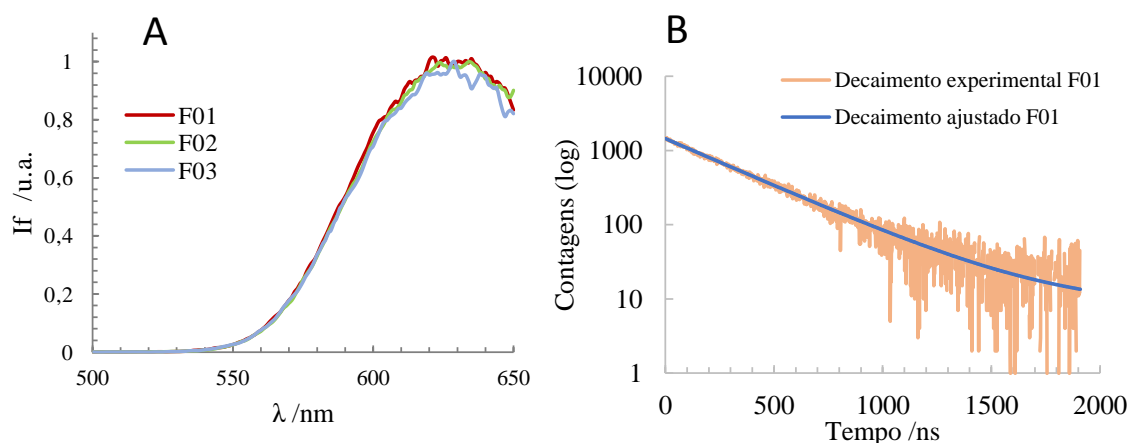


Figura 3.14: A) Espectros de emissão normalizados dos complexos F01, F02 e F03 em DMSO(2%)/HEPES ($\lambda_{\text{exc}} = 455/460$ nm; $T = 25,0 \pm 0,1$ °C); B) Decaimento experimental da intensidade de emissão e respetivo ajuste obtido para o complexo F01 em DMSO(2%)/HEPES ($\chi^2 = 1,00$; $\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 630$ nm). O ajuste foi efetuado usando uma função de soma de exponenciais (ver parte experimental, equação 5.2).

Tabela 3.6: Resultados obtidos por espectroscopia de emissão para os complexos F01 a F03 em em DMSO(2%)/HEPES. O tempo de vida médio do estado excitado (τ_0) foi obtido por ajuste dos decaimentos de intensidade obtidos experimentalmente à equação $\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i$ ($T = 25,0 \pm 0,1$ °C) ; outras condições experimentais – ver secção 5.2.4) .

Complexo	Solvente	λ_{exc} /nm	$\lambda_{máx}^{em}$ /nm	τ_0 /ns (χ^2)	C / μ M	T /°C
F01	DCM	455, 435, 360, 290	625	-	2,5	$25,0 \pm 3$
	ACN	455, 425, 325, 288	637	-	4,0	$25,0 \pm 3$
	DMSO(2%)/HEPES	455 e 295	631	351 (1,05)	4,9	$25,0 \pm 0,1$
F02	DCM	455, 430, 395, 360, 325, 290	623	-	5,0	$25,0 \pm 3$
	ACN	455, 435, 360, 395, 326, 290	639	-	5,0	$25,0 \pm 3$
	DMSO(2%)/HEPES	455 e 295	637	383 (1,12)	4,4	$25,0 \pm 0,1$
F03	DCM	460, 430, 395, 355, 330, 289	608	-	10	$25,0 \pm 3$
	ACN	455, 425, 390, 355, 287	624	-	5,0	$25,0 \pm 3$
	DMSO(2%)/HEPES	455 e 295	634	345 (1,02)	5,2	$25,0 \pm 0,1$

Valores de comprimento de emissão máximo para o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ em água (627 nm; 25°C) obtidos por Henderson *et. al.* [61] estão em concordância com os obtidos em DMSO(2%)/HEPES para os complexos em estudo. O tempo de vida publicado para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ é 630 ns, ou seja, é da mesma ordem de grandeza que o tempo de vida obtido para os complexos F01 a F03, embora um pouco superior. A diferença entre eles pode-se dever tanto aos diferentes solventes utilizados, como à funcionalização de uma das bipyridinas (no caso dos complexos em estudo), que facilita a dispersão da energia do estado excitado por processos não radiativos (ex. vibracionais).

Dependendo da natureza do estado excitado, a luminescência é subdividida em 2 categorias: fluorescência e fosforescência. Em ambos os casos o eletrão é excitado por incidência de radiação com uma energia E ($E = h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν a frequência do fóton da luz incidente). Em fluorescência, o eletrão excitado mantém a sua orientação spin oposta à do eletrão no estado fundamental. Assim, o regresso desse eletrão ao estado fundamental é um processo permitido e ocorre quase instantaneamente, libertando-se um fóton no processo. [62] Em espécies fosforescentes, o eletrão excitado sofre conversão intersistemas (Figura 3.15), ou seja, inverte a sua orientação de spin, passando ao estado tripleto. Por este motivo, chegando ao nível vibracional mais baixo deste estado, a sua transição para o estado fundamental não é permitida pelo princípio de exclusão de Pauli. [63] É necessário esperar que o eletrão volte a inverter o seu spin, e como tal esta transição demora muito mais tempo a ocorrer, o que se traduz por um tempo de vida do estado excitado longo.

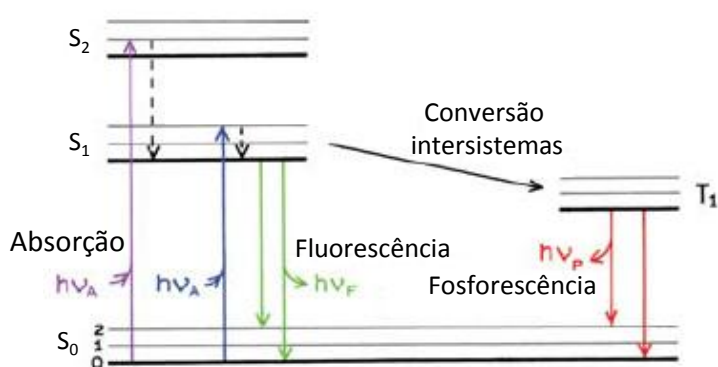


Figura 3.15: Diagrama de Jablonski, adaptado de [62].

Em complexos com transições metal-ligando, no entanto, esta distinção não é linear pois verificam-se estados eletrônicos mistos singleto-triplete, o que origina tempos de vida intermédios na ordem das centenas de nanossegundos ou alguns microssegundos. [62] Os valores de tempo de vida médio obtidos experimentalmente para os complexos de ruténio em DMSO(2%)/DMEM (Tabela 3.6) encontram-se entre 345 e 504 ns, como esperado para esta última categoria de compostos luminescentes.

Para verificar se os ensaios de emissão provocam a degradação dos complexos em DMSO(2%)/HEPES ($\lambda_{\text{exc}} = 455$ e 295 nm), obtiveram-se também espectros de absorção (UV-Vis) de cada solução antes e após cada ensaio. Observou-se uma pequena diminuição da intensidade das bandas de MLCT, de 1,4% (F01), 1,3% (F02) e 1,9% (F03), indicando que, em especial para os complexos funcionalizados com o macroligando, não ocorre degradação significativa no tempo da experiência.

3.2.5. Caracterização por Voltametria Cíclica

Estes estudos foram realizados no Instituto Superior Técnico com o auxílio da Professora Paula Robalo do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), e de Oscar Rojas, da *Universidad de la Coruña*.

Para caracterizar os processos de oxidação e redução dos complexos foram feitos ensaios de voltametria cíclica para cada um deles, em dois solventes diferentes, diclorometano (DCM) e acetonitrilo (ACN) previamente secos e destilados, usando como eletrólito de suporte o hexafluorofosfato de tetrabutylamónio (0,02 M em DCM e 0,01 M em ACN). A concentração dos complexos em estudo é de $1,0 \times 10^{-3}$ M. O complexo F03 já se encontra caracterizado na bibliografia, onde foram registados processos redutivos reversíveis a -1,50 V, -1,68 V e -1,91 V, e um processo oxidativo reversível a 1,09 V, usando como o solvente acetonitrilo (*vs* SCE). [64] Lee et. al., no entanto,

não refere condições experimentais adicionais, pelo que comparações diretas com os complexos F01 e F02 devem ser feitas com cautela.

Verifica-se que, independentemente do solvente, ambos os complexos F01 e F02 apresentam um processo redox *quasi*-reversível Ru(III)/Ru(II) a potenciais positivos. Os valores destes encontram-se explícitos na Tabela 3.7, onde também se encontram dados obtidos por Lee *et. al.* [64], Charboneau *et. al.* [65] e Nogueira *et. al.* [66].

Também em todos os ensaios se observa que os processos redox dos ligandos bipyridina se encontram na zona negativa de potenciais, indicando que estas sofrem reduções. Em diclorometano só se observa um processo nessa zona para o complexo F02, mas não se observa nenhum para F01. Em ACN encontram-se, para ambos os complexos, 3 processos redox *quasi*-reversíveis e um de redução irreversível (Figura 3.16).

Tabela 3.7: Caracterização dos complexos F01, F02 e F03, bem como do complexo precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$, ligandos bpy, $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$, e complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ por voltametria cíclica, em acetonitrilo e diclorometano.

Solvente	Complexo	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_{p} (mV)	$ i_{\text{pc}}/i_{\text{pa}} $
ACN	F01	1,55	1,47	1,51	80	1,0
		-	-1,04	-	-	-
		-1,11	-1,17	-1,14	60	-
		-1,32	-1,42	-1,37	100	0,4 ^a
		-1,54	-1,65	-1,60	110	0,9 ^a
	F02	1,39	1,31	1,35	80	1,0
		-	-1,22	-	-	-
		-1,29	-1,36	-1,33	70	-
		-1,50	-1,57	-1,55	70	0,7 ^a
		-1,75	-1,82	-1,79	70	0,8 ^a
	F03 ^b	-	-	1,09	-	-
		-	-	-1,50	-	-
		-	-	-1,68	-	-
		-	-	-1,91	-	-
	$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+ \text{ c}}$	-	-	1,30	-	-
		-	-	-1,33	-	-
		-	-	-1,53	-	-
		-	-	-1,79	-	-
	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{\text{e}}$	0,36	0,28	0,32	73	0,8
	bpy ^d	-	-1,30	-	-	-
	$\text{Bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2^{\text{d}}$	-	-	-	-	-
DCM	F01	1,21	1,11	1,16	100	1,0
		0,55	-	-	-	-
		-	-0,30	-	-	-
	F02	1,43	1,32	1,38	110	1,0
		-	-1,25	-	-	-
	$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{\text{e}}$	0,40	0,33	0,37	-	-
	bpy ^d	-	-	-	-	-
	$\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2^{\text{d}}$	-	-	-	-	-

a) $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$; b) Valores obtidos por Lee et. al. [64]; c) Valores obtidos por Charboneau et. al. [65]; d) Valores obtidos por Nogueira et. al. [66]; e) Resultados não publicados, disponíveis no grupo de Química Organometálica, FCUL.

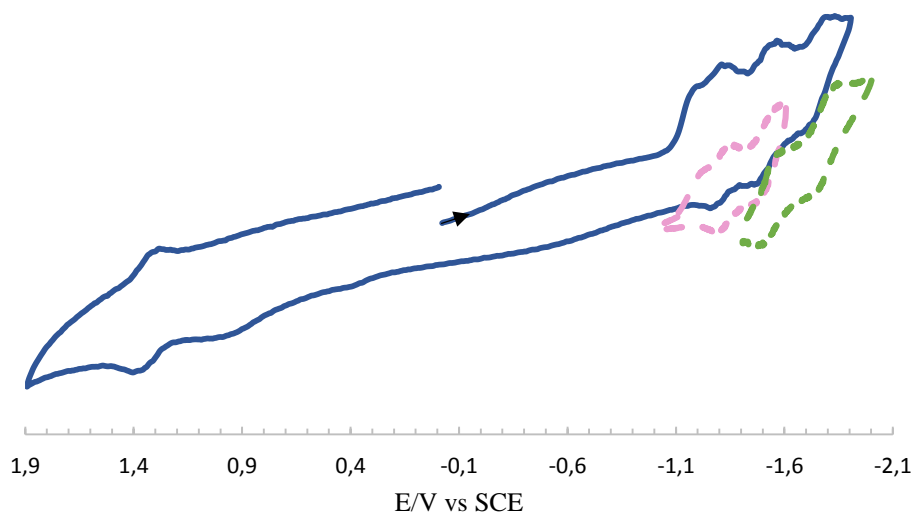
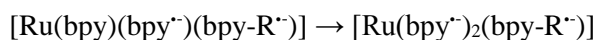
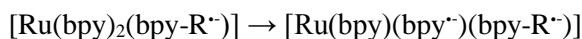
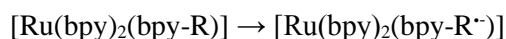


Figura 3.16: Voltamograma do complexo F02 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em acetonitrilo, $v=200\text{mV/s}$. Os voltamogramas a tracejado referem-se ao isolamento de processos das bipyridinas entre -1 V e -1,6 V (rosa) e entre -1,4 V e -2 V (verde), $v=200\text{mV/s}$.

A sequência de processos observados a potenciais negativos (Figura 3.16) pode ser interpretada como uma redução passo a passo de cada sistema \square independente, considerando que as reduções ocorrem numa zona de potencial usualmente encontrada para este tipo de compostos. [67], [68] Abaixo encontra-se uma sequência de passos possível para estas reduções, exemplificada para os complexos sintetizados neste trabalho, de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-R})]$, em acetonitrilo:



Nos voltamogramas em diclorometano de ambos os complexos (exemplificado na Figura 3.17 com F02 em DCM) é, como referido, possível observar o processo redox correspondente ao centro metálico de ruténio na zona de potenciais positivos ($E_{1/2} = 1,16\text{V}$ para F01 e $1,37\text{V}$ para F02). No entanto apenas no voltamograma do complexo F02 em DCM se observa um processo irreversível, correspondente a um dos ligandos.

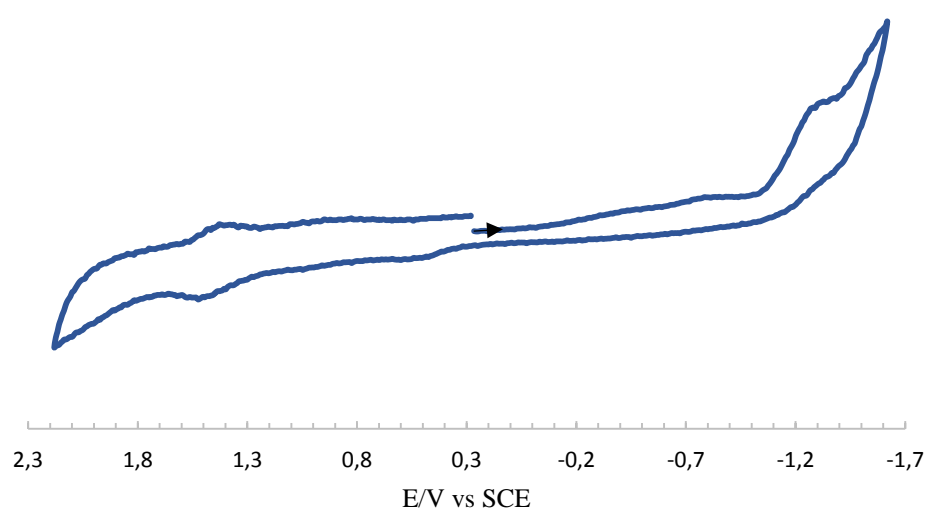


Figura 3.17: Voltamograma do complexo F02 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em diclorometano, $v=200\text{mV/s}$.

Capítulo 4 - Estudos *in vitro*

4.1. Estabilidade em solução

A estabilidade em solução de um complexo é importante num contexto de aplicação terapêutica. O seu estudo fornece informação essencial para se avaliar se o composto em causa mantém a sua estrutura quando dissolvido, com o objetivo de compreender o seu comportamento quando sujeito a diversas condições, por exemplo de armazenamento e exposição (temperatura, humidade, luminosidade, etc.), durante um período de tempo definido. Os compostos podem degradar-se por diversos mecanismos, como por exemplo oxidação, redução, fotólise e hidrólise, o que pode comprometer a sua eficácia. Podem também dar origem a produtos de decomposição tóxicos. [69]. A hidrólise é um processo particularmente importante no caso de complexos de iões metálicos, suscetíveis de sofrer reações de permuta de ligandos em solventes coordenantes, originando uma nova espécie química que pode ser a espécie realmente ativa do complexo em estudo, comportando-se este, nesse caso, como um pró-fármaco.

Assim, estes estudos foram efetuados por espectroscopia de UV-Visível (avaliando eventuais alterações na forma e intensidade do espectro eletrónico ao longo de 24 horas) usando como solventes DMSO, e soluções aquosas de HEPES e DMEM. Nestes dois últimos casos, foi necessário usar DMSO como co-solvente em baixa percentagem (v/v), de 1 a 5%. O HEPES é uma solução tampão que pode ter pH entre 6,8 e 8,2. [70] A solução utilizada neste trabalho foi preparada de forma a ter pH = 7,4, o pH do plasma sanguíneo. [71]

A escolha destes solventes prende-se com a sua utilização nos estudos posteriores de interação com moléculas biológicas de interesse e ensaios de viabilidade celular:

- DMSO: Os complexos em estudo revelaram ser insolúveis em meio aquoso. Sendo o DMSO uma molécula anfifílica (solúvel tanto em fase aquosa como orgânica) tem a capacidade de dissolver os complexos, formando uma solução miscível com as soluções aquosas de HEPES e DMEM. [72]
- HEPES: Este meio aquoso tamponizado (pH 7.4) foi utilizado nos estudos *in vitro* da interação dos complexos com albumina (HSA, na secção 4.2);
- DMEM: Meio de cultura (disponível comercialmente) usado durante os ensaios de viabilidade celular em linhas tumorais humanas;

Foram feitos testes de solubilidade e estabilidade de todos os complexos em DMSO para garantir que este poderia ser usado como co-solvente. Nos testes de solubilidade foi possível, para todos os complexos, preparar soluções em DMSO/HEPES com uma percentagem mínima de 0,5%(v/v) de

DMSO sem se observar qualquer precipitação dos complexos. Esta percentagem é inócua para os estudos com células e para os estudos com proteína.

A estabilidade dos três complexos foi seguida ao longo de 24 horas em DMSO por UV-Vis, tendo-se verificado apenas pequenas variações de intensidade tanto nas bandas de MLCT como nas das bipyridinas. Ao longo deste período, os complexos mantiveram-se inalterados numa extensão superior a 90%, especificamente 95,7% para F01, 99,8% para F02 e 90,2% para F03, e pode concluir-se que o DMSO é adequado para o uso como co-solvente nos estudos em meio aquoso.

Na figura 26 apresenta-se a evolução do espectro eletrónico do complexo F01 em DMSO(1%)/HEPES, ao longo de 1645 minutos (27h21 min). Nas primeiras 7 horas as intensidades das bandas não sofreram desvios superiores a 5,5% relativamente à intensidade do espectro inicial (Figura 4.1). Ao fim de ~27h verificou-se uma diminuição generalizada de intensidade, sendo as variações de cerca de -13,6% para a banda de MLCT (454 nm) e -14,4% para a banda da bipyridina (288 nm).

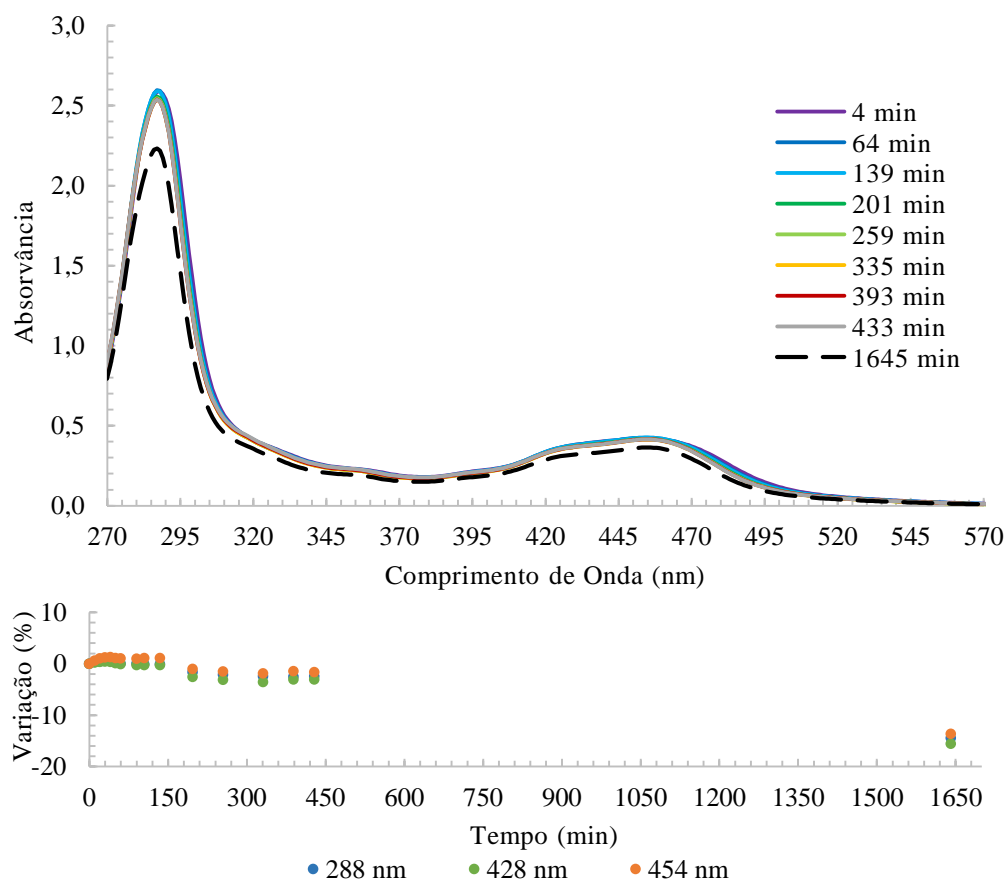


Figura 4.1: Estabilidade do complexo F01 em DMSO(1%)/HEPES a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $45,0 \mu\text{M}$ ao longo de 27,42 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 4$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 4 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 86,4% ao fim das 27 horas.

Quanto ao complexo F02 (para DMSO(1%)/HEPES), a forma do espectro não se altera ao longo do tempo, apenas perdendo alguma intensidade (Anexo 13). No entanto a variação desta nunca atinge os -5,0% antes de $t = 274$ min (5h34 min). Ao fim das 24 horas a banda de MLCT (453 nm) teve uma variação de intensidade de -11,9% relativamente à primeira medição ($t = 6$ min), e a banda da bipyridina (287 nm) sofreu uma diminuição de -13,9%. Para o complexo F03 as variações observadas ao fim das 24 horas foram de -14,0% e -13,8% para as bandas de MLCT (455 nm) e das bipyridinas (287 nm), respetivamente (Anexo 14).

Até aqui os resultados mostram-se consistentes: a intensidade do espectro de todos os complexos diminui de forma ligeira nas primeiras 5 a 7 horas de experiência, culminando numa diminuição de cerca de 13% ao fim das 24 horas (banda MLCT). Por outras palavras, pode-se concluir que em solução de DMSO/HEPES ao fim de 24 horas, os complexos mantêm a sua estrutura original em aproximadamente 85% (em concreto, 86% para F01 e F03, e 88% para F02). Estes valores são satisfatoriamente elevados e, como tal, este solvente é adequado e poderá ser utilizado em estudos posteriores.

Na Figura 4.2 podem-se observar os resultados do estudo de estabilidade do complexo F01 em DMSO(5%)/DMEM. A perda de intensidade ao longo do tempo é mais acentuada que no estudo em HEPES. Verifica-se uma maior alteração na banda mais intensa correspondente às transições intramoleculares que ocorrem nas bipyridinas. Até às 7,8 horas de estudo (468 min) a banda desloca-se 2 nm - para comprimentos de onda menores. Ao fim das 24 horas o máximo de absorção localiza-se novamente ao mesmo λ que em t_{mix} , mas a forma da banda é mais esguia.

As alterações nesta banda podem significar que um ou mais constituintes da matriz complexa do DMEM estão a interagir com os ligandos. Apenas recorrendo a outras técnicas seria possível averiguar se o ligando está a sofrer alguma degradação, ou se as mudanças do espectro se devem apenas a efeitos relacionados com interações eletrostáticas provocadas pela interação com o solvente.

Quanto à variação de intensidade, ainda na Figura 4.2, pode observar-se que até às 24 horas, a banda de MLCT (451 nm) sofreu uma diminuição de -12% e que a banda mais intensa referente às bipyridinas (290 nm) sofreu também uma perda de intensidade -17%.

Ao contrário do que aconteceu com F01, não se observam perdas de intensidade tão pronunciadas no espectro do complexo F02 em DMSO(5%)/HEPES, ao longo de 24 horas. No Anexo 15 é possível observar que até ao tempo $t = 378$ min (6h18 min) as bandas a 289 e 454 nm (bpy e MLCT, respetivamente) não sofrem variações superiores a 2,1%. Entre este tempo e as 24 horas houve um pequeno aumento de intensidade na ordem dos 7,4% (454 nm) e 2,2% (289 nm). Similarmente ao que aconteceu com F01, também no caso do F02 a banda mais intensa fica ligeiramente mais esguia ao fim das 24h, o que pode resultar de interações com um ou vários componentes do DMEM.

Finalmente, no estudo de estabilidade do complexo F03 em DMSO(2%)/DMEM obteve-se uma variação de absorvância de -2,3% e 0,1% para as bandas da MLCT e bipyridina respetivamente, ao final

de 24 horas (Anexo 16). Desta vez a banda da bipyridina manteve a sua forma, o que sugere que nos dois complexos anteriores o DMEM poderá estar a causar alterações predominantemente na cadeia polimérica.

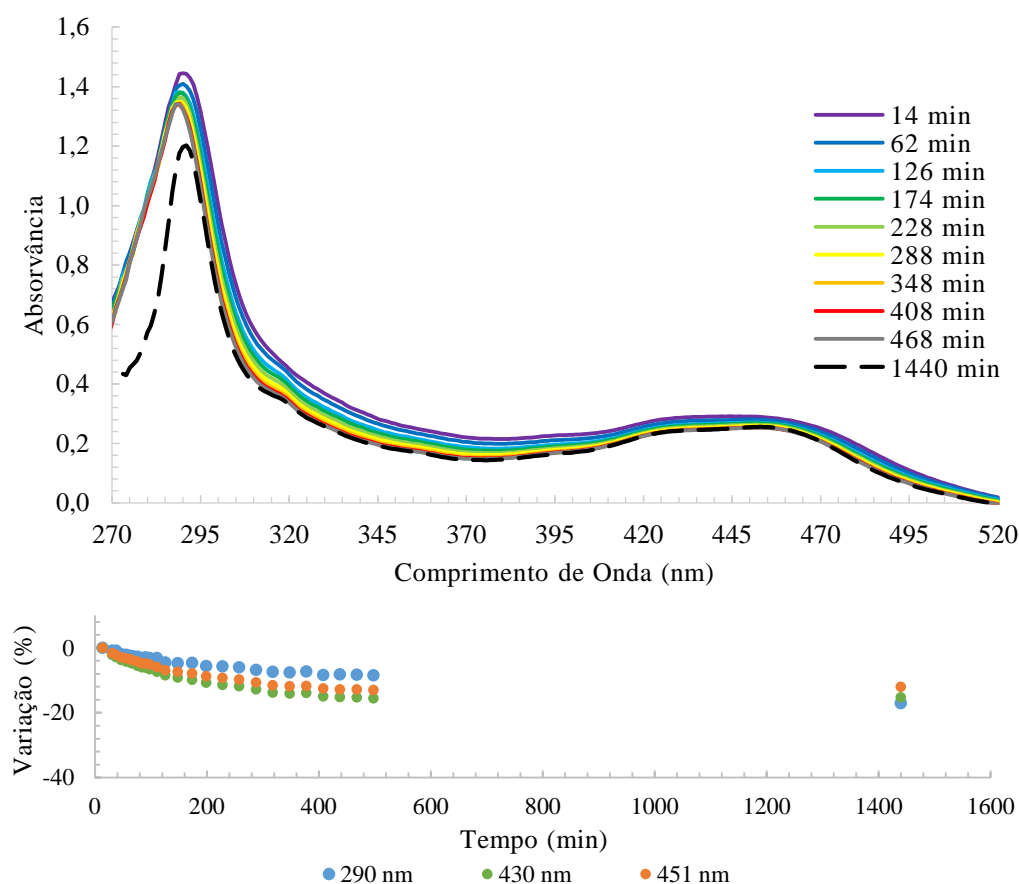


Figura 4.2: Estabilidade do complexo F01 em DMSO(5%)/DMEM a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $39,7 \mu\text{M}$ ao longo de 24 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 14$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 14 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 88,0% ao fim das 24 horas.

Em suma, os resultados da estabilidade em DMSO/DMEM revelam que a coordenação dos complexos se mantém intacta até uma extensão de 88% (F01), 93% (F02) e 98% (F03), indicando que os complexos em estudo mantêm a sua formulação inicial em grande extensão no meio de cultura celular, sugerindo que poderá ser essa a entidade responsável pelo seu eventual efeito biológico.

4.2. Estudo *in vitro* com moléculas de interesse biológico: interação com a albumina humana

A espectroscopia de emissão (fluorescência e fosforescência) é uma técnica muito utilizada no âmbito de estudos em complexos de coordenação emissivos pelas diversas aplicações que esta propriedade lhes confere. [41-44] Estes estudos têm vindo a ser aplicados em complexos de ruténio com bipyridinas, entre outros da mesma família, desde que as propriedades fotofísicas do $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ foram pela primeira vez documentadas em 1959 por Paris *et. al.* [73]

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada não só para fazer a caracterização dos complexos, como também para o estudo de interações com proteínas, nomeadamente para delinear o papel que a albumina pode desempenhar (se algum) nos mecanismos de transporte dos complexos no organismo. Estes detêm uma importância comparável aos mecanismos de citotoxicidade uma vez que os compostos devem idealmente conseguir atravessar o organismo de forma inativa, e sem que a sua interação com o transportador diminua a sua atividade uma vez chegados ao alvo.

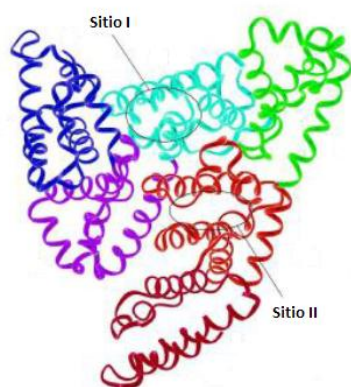


Figura 4.3: Representação da Albumina Sérica Humana, adaptado de [78], com a localização dos sítios de ligação de Sudlow I e II.

No contexto do transporte no plasma sanguíneo, a albumina do plasma humano (HSA) é a proteína transportadora mais abundante no sangue, perfazendo cerca de 60% da quantidade total de proteínas no plasma. As suas funções incluem (entre outras) o transporte de ácidos gordos, de iões metálicos (Cu^{II} , Ni^{II} , Ca^{II} e Zn^{II}), de muitos compostos endógenos e exógenos, sendo a proteína de ligação e transporte não específica mais frequente e importante do organismo humano. [1] [14] Tal como a albumina, a transferrina humana (hTf) é também uma proteína transportadora, sendo uma das suas funções principais o transporte e captação celular do ferro, que o ruténio mimetiza.

Um exemplo da importância da ligação de complexos com proteínas séricas reside no facto de a bioatividade do KP1019 depender fortemente da sua ligação com as proteínas HSA e transferrina, que previnem a sua hidrólise e precipitação a $\text{pH} = 7,4$. [14], [74], [75] A hTf contribui também de forma significativa no processo de captação celular deste e de outros complexos de ruténio, uma vez que o rápido desenvolvimento dos tecidos tumorais implica um maior consumo de ferro (aqui substituído por complexos de ruténio) providenciado pela transferrina. [14], [75], [76]

Assim, os complexos de ruténio mostraram já beneficiar das proteínas séricas para a sua estabilidade no sangue, o seu transporte e (eventualmente) um aumento da seletividade. [14] Em alguns

casos ainda, a ligação dos complexos às proteínas melhora a sua citotoxicidade, por formação de aductos mais ativos que o complexo parental. Apesar de se saber que complexos de ruténio se ligam a ambas as proteínas separadamente após um período de incubação em solução tampão, os compostos mostraram ligar-se preferencialmente à albumina em soro do sangue ou condições análogas (em que se mimetiza a concentração relativa *in vivo* destas proteínas). [14], [74]

Outra característica importante da albumina é que, apesar de ter vários resíduos fluorescentes, como fenilalaninas e tirosinas [77], tem apenas um único resíduo triptofano (Trp214) que se encontra numa zona da proteína entre os sítios de ligação mais importantes, os sítios de Sudlow I e II (cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IIA e IIIA da proteína, respetivamente). Ao sítio I ligam-se moléculas volumosas carregadas negativamente, e moléculas heterocíclicas, e no sítio II ligam-se preferencialmente ácidos carboxílicos aromáticos pouco volumosos, como é o caso de alguns fármacos anti inflamatórios. [14], [78], [79]

A localização do triptofano entre esses dois subdomínios torna-o sensível a mudanças no ambiente causadas por alterações estruturais resultantes de ligações de moléculas à albumina. [1] Ao excitar seletivamente o Trp214 ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 334 \text{ nm}$) é possível estudar a interação entre a proteína e os complexos, sendo que as alterações registadas refletem, em teoria, a ligação dos complexos em estudo ao sítio I, dada a localização deste resíduo na proteína e por ser aí que se ligam moléculas volumosas e heterocíclicas.

Tal como a albumina, também os complexos sintetizados no âmbito deste trabalho são luminescentes à temperatura ambiente. Por este motivo foi escolhida a espectroscopia de emissão para estudar a interação entre eles. Como referido acima, a albumina pode ser excitada a 295 nm (c.d.o. de excitação do Trp214), obtendo-se um espectro de emissão contendo uma banda larga com máximo de intensidade a cerca de 340 nm (Figura 4.4, linha azul). Quando os complexos são excitados a qualquer um dos comprimentos de onda correspondentes aos seus máximos de absorção e ombros (Anexo 10), dão origem a uma banda de emissão larga, cujo máximo de intensidade se encontra a cerca de 630 nm (Figura 4.4, linha laranja), e é independente do comprimento de onda de excitação. Nos ensaios que se seguiram, os complexos foram sempre excitados a 455 nm (banda de MLCT).

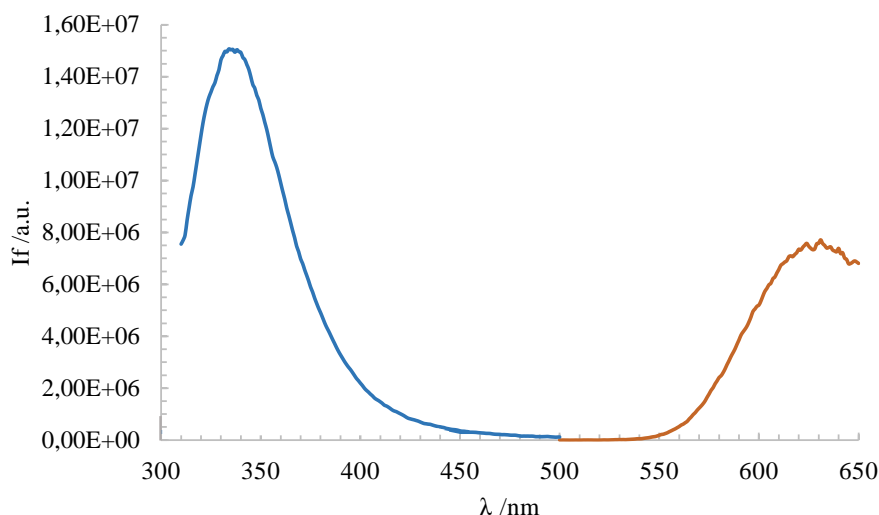


Figura 4.4: Espectro de emissão de uma solução de complexo F01 e HSA (1:1) de concentração 5 μ M em DMSO(2%)/HEPES, quando excitada a 295 nm (linha azul; $\lambda_{em(máx)} = 340$ nm – emissão referente à proteína) e 455 nm (linha laranja; $\lambda_{em} = 340$ nm – emissão referente ao complexo).

O comportamento dos espectros de emissão descrito acima é idêntico ao observado em soluções contendo apenas a proteína ou complexo, dependendo do comprimento de onda de excitação selecionado. Por outro lado, à medida que se aumenta a concentração do complexo em estudo, a intensidade de emissão da albumina vai diminuindo sem desvio de $\lambda_{em(máx)}^{em}$, como exemplificado para o complexo F01 no Anexo 18, ou seja, a adição de complexo provoca a extinção da fluorescência intrínseca da proteína. Os complexos F02 e F03 seguem a mesma tendência que o F01 nos valores obtidos para a intensidade de emissão relativa, %If. Na Figura 4.5 relaciona-se esta intensidade relativa com o aumento da concentração dos três complexos em estudo e evidencia que a extensão de *quenching* é sensivelmente igual para os complexos com macroligando e é ligeiramente menor (~5%) para o caso do F03. Assim, verifica-se que todos os complexos provocaram uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência da proteína.

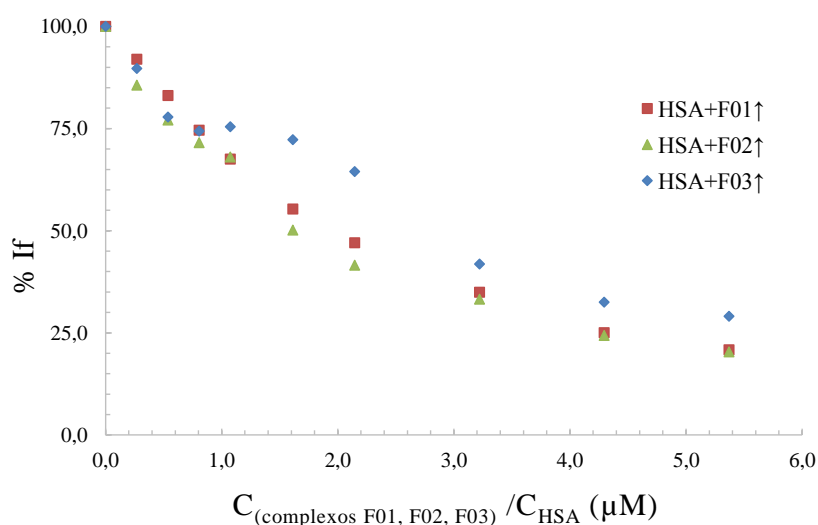


Figura 4.5: Gráfico com a representação da diminuição das intensidades relativas do Trp214 ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$) no estudo por fluorescência em DMSO(2%)/HEPES a $25 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$ da interação dos complexos F01, F02 e F03 com HSA, mantendo C_{HSA} constante e aumentando C_{complexo} .

Uma análise de Stern-Volmer é útil na compreensão do mecanismo responsável por essa diminuição de intensidade de emissão. Na Figura 4.6 encontra-se o gráfico de Stern-Volmer referente aos ensaios de interação do complexo F01 com a proteína HSA. A razão I_{f0}/I_f entre as intensidades dos espectros de emissão da proteína na ausência (I_{f0}) e na presença do complexo (I_f), que aumenta com o aumento de C_{Complexo} , é bem descrita pela variação quadrática 4.1 (ajuste para todos os pontos, $R^2 = 0,998$):

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = (2,8648 \times 10^{-3}) C_{\text{complexo}}^2 + (8,7332 \times 10^{-2}) C_{\text{complexo}} + 1 \quad (4.1)$$

Comparando esta equação com a equação 4.2 [24],

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = (k_1 \times k_2) C_{\text{complexo}}^2 + (k_1 + k_2) \cdot C_{\text{complexo}} + 1 \quad (4.2)$$

(equação teórica, na qual K_1 e K_2 representam constantes associadas a cada processo de *quenching*) esperar-se-ia que os parâmetros ajustados tivessem o significado de $K_1 \times K_2$ e de $K_1 + K_2$. No entanto, os coeficientes obtidos conduzem a valores para K_1 e K_2 que não têm significado físico.

Estes pontos experimentais são também bem descritos por um ajuste linear. O melhor ajuste linear obtido é traduzido pela equação 4.3 (ajuste com 8 pontos; $R^2 = 0,993$, excluindo os valores de concentração de complexo acima de 19,7 μM) ou pela equação 4.4 ($R^2 = 0,973$, usando todos os pontos experimentais).

$$\frac{I_{f_0}}{I_f} = (1,1771 \times 10^5) \cdot C_{\text{complexo}} + 1 \quad (4.3)$$

$$\frac{I_{f_0}}{I_f} = (1,4293 \times 10^5) \cdot C_{\text{complexo}} + 1 \quad (4.4)$$

Uma vez que a intensidade de fluorescência da proteína em solução diminui com a adição de complexo e os espectros de emissão normalizados não apresentam desvios (Anexo 17.B) é razoável considerar que o mecanismo envolvido poderá ser *quenching* estático, embora seja necessário recorrer a medidas de fluorescência resolvidas no tempo para validar essa hipótese. Num mecanismo de *quenching* estático o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo não será alterado por adição do complexo. A verificar-se essa hipótese, o facto de o mecanismo envolvido ser *quenching* estático indica a formação de um aducto 1:1 entre a proteína e o complexo, no estado fundamental não fluorescente, de acordo com o equilíbrio 4.5:



com uma constante de ligação K_{SV} . Neste caso, a equação 4.6 descreve a variação de I_{f_0}/I_f com o aumento da concentração de complexo:

$$\frac{I_{f_0}}{I_f} = k_{SV} \cdot C_{\text{Complexo}} + 1 \quad (4.6)$$

e o declive do ajuste linear no gráfico de Stern-Volmer pode ser interpretado como K_B . Os valores de K_B e $\log K_B$ obtidos para os complexos F01 e F02 encontram-se na Tabela 4.1. Foi também calculada, para estes complexos, a constante de dissociação do aducto $\{(\text{HSA})-(\text{complexo})\}$, $K_D = 1/K_B$. Estes cálculos não foram efetuados para o complexo F03 devido ao mau ajuste obtido.

Os valores de $\log K_{SV}$ e K_D obtidos indicam que a interacção destes complexos com a HSA é moderada a forte, sugerindo que é plausível considerar que podem ser transportados no sangue através da ligação a esta proteína. [24], [78]

Tabela 4.1: Valores de K_{SV} , $\log K_{SV}$, e K_D para os complexos F01 e F02, obtidos do gráfico de Stern-Volmer por um ajuste linear ($n = 8$ e 10 pontos).

Complexo	K_{SV}/M^{-1} (n ; R^2)	$\log K_{SV}$	$K_D/\mu M$
F01	$1,177 \times 10^5$ (8; 0,993)	5,07	8,5
	$1,429 \times 10^5$ (10; 0,973)	5,16	7,0
F02	$1,356 \times 10^5$ (8; 0,995)	5,15	7,1
	$1,531 \times 10^5$ (10; 0,990)	5,21	6,2

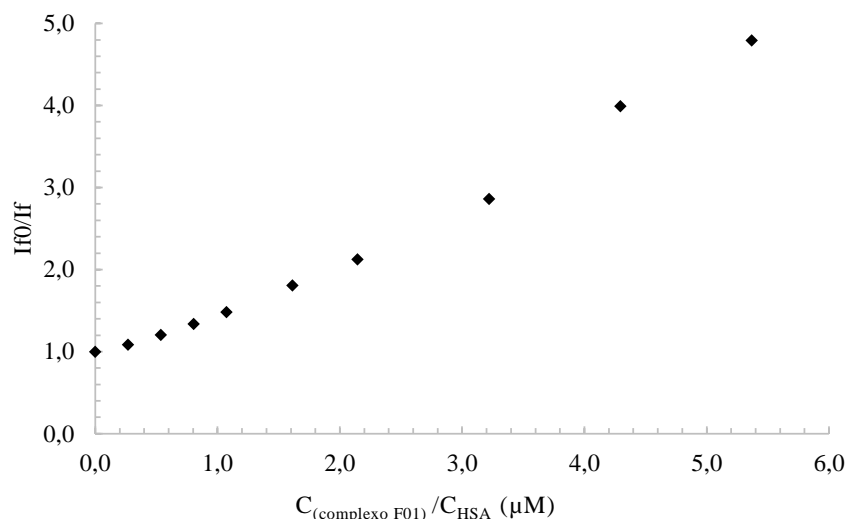


Figura 4.6: Interação do complexo F01 com a albumina humana: gráfico de Stern-Volmer ($\lambda_{em} = 340$ nm) obtido para soluções de HSA e F01, incubadas durante 22 horas a $37^\circ C$ em DMSO(2%)/HEPES, $pH = 7,4$ ($C_{HSA} = 4,58 \mu M$, $C_{Complexo} = 0$ a $25 \mu M$, $T = 25 \pm 0,1^\circ C$).

É também possível seguir esta interação entre a proteína e os complexos através da luminescência destes últimos. Nesses ensaios, os complexos em solução foram excitados a 455 nm, e a sua emissão observada entre 500 e 650 nm (exemplificado para o complexo F01 no Anexo 19). Na presença de proteína, a intensidade de emissão do complexo não sofre variação apreciável face à emissão na ausência de HSA para o caso do complexo F03 (variação máxima de $4,3\%$). No entanto, no caso dos dois complexos com polímero, a intensidade de emissão de F01 aumentou $43,4\%$ na presença de HSA na proporção $1:1$ (Figura 4.7), tendo-se essa intensidade mantido constante para concentrações de proteína superiores. O complexo F02 exibiu um comportamento semelhante, tendo a intensidade de emissão aumentado $24,5\%$ até à concentração de HSA de $8,9 \mu M$ ($1:2,1$; F02:HSA; $C_{F02} = 4,4 \mu M$), e estabilizado a essa percentagem para concentrações de F02 mais elevadas. Desta forma, na presença da proteína observa-se que a intensidade de emissão aumenta, indicando que a luminescência é favorecida em detrimento de processos não-radiativos.

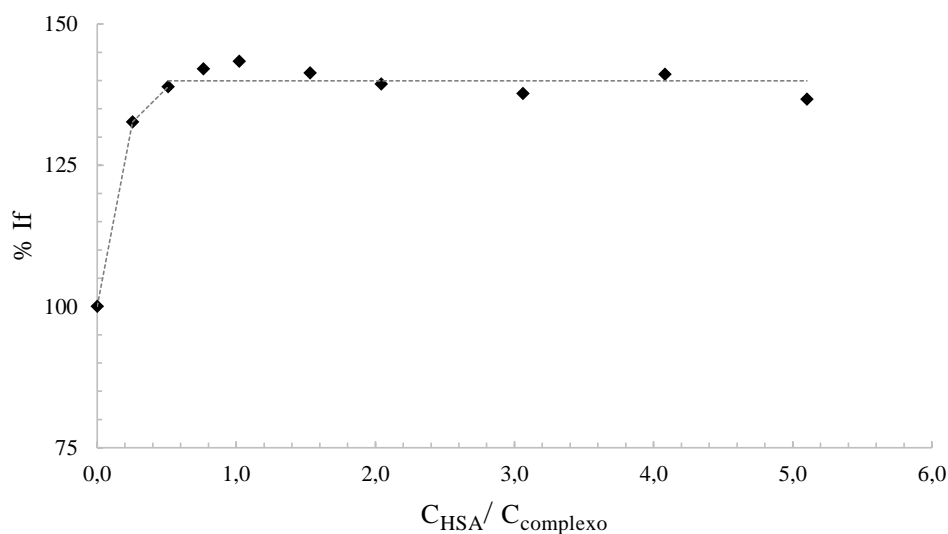


Figura 4.7: Gráfico das intensidades relativas do complexo F01 ($c = 4,88 \mu M$) com o aumento da concentração de HSA em DMSO(2%)/HEPES. ($\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$).

Estes resultados indicam que na interação dos complexos com macropolímero com a a emissão do complexo não é inibida, pelo contrário, aumenta. Isto sugere que em sistemas biológicos a interação destes complexos com proteínas no organismo não interfere com a sua capacidade de emitir luminescência.

Em suma, a interação dos compostos com a HSA é verificada de duas formas distintas. Por um lado, a diminuição pronunciada da intensidade de emissão do resíduo Trp214 indica que existe interação entre esta proteína e os complexos, e essa ligação possivelmente ocorre na proximidade deste resíduo (no subdomínio IIA da proteína, onde se situa o denominado sítio I de Sudlow) sob com a formação de aductos. A ligação dos complexos à proteína resulta num aumento da intensidade da sua emissão. No seu conjunto, os resultados indicam que a interação dos complexos com a proteína é moderada a forte, sugerindo que poderão ser eficientemente transportados pela HSA, sem perderem as suas propriedades luminescentes.

4.3. Atividade *in vitro* em células tumorais humanas: ensaios de viabilidade celular

Os estudos de viabilidade celular foram realizados pela Doutora Catarina Roma-Rodrigues, sob supervisão da Professora Alexandra Fernandes, no *UCIBIO*, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Foi utilizado nestes ensaios o método do MTS. Este segue o princípio que enzimas nas células que sobrevivem à administração dos complexos reduzem o sal MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), transformando-o em formazan. A quantidade de formazan produzido pode ser determinada por medição da absorvância a 490 nm, e é diretamente proporcional ao número de células vivas. [80], [81]

Os complexos sintetizados neste trabalho foram testados nas linhas celulares A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, exemplificado na Figura 4.8 para o complexo F01), MCF7 (adenocarcinoma da mama hormono-dependente humano) e em fibroblastos, células não-tumorigénicas. Cada ensaio foi realizado em triplicado biológico, e cada um desses teve triplicado técnico. Gráficos adicionais podem ser consultados no Anexo 20.

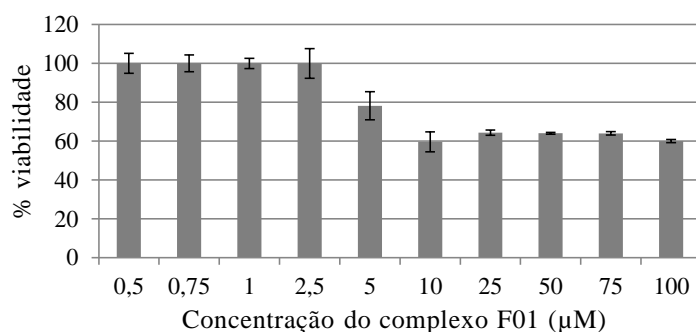


Figura 4.8: Resultados de viabilidade celular na linha celular A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, sensível à cisplatina) para o complexo F01. O tempo de incubação foi 48 horas.

Nenhum dos complexos apresentou citotoxicidade a baixas concentrações nas linhas MCF7 e fibroblastos, e apenas o complexo F03 induz morte celular na linha A2780, com um valor de $IC_{50} = 0,56 \mu M$ (Tabela 4.2). Este valor é melhor do que o obtido para a cisplatina (72h de incubação) por Tomaz *et. al.* [24] ($2,5 \pm 0,3 \mu M$), mas não supera o valor de IC_{50} obtido pelo mesmo grupo para o complexo TM34 ($0,14 \pm 0,01 \mu M$). Ainda na linha celular A2780, o complexo F01 foi um pouco mais eficiente que o F02, tendo começado a induzir morte celular entre 2,5 e 5 μM (Figura 4.8). Os complexos F01 e

F02 não apresentaram qualquer atividade nos fibroblastos, cuja viabilidade se manteve a 100% a todas as concentrações testadas.

Tabela 4.2: Resultados de citotoxicidade, expressa em μM , para os complexos F01, F02 e F03 nas linhas celulares A2780, MCF7 e fibroblastos, com tempo de incubação de 48h a 37°C.

Complexo	A2780	MCF7	Fibroblastos
F01	> 100	> 100*	> 100*
F02	> 100	> 100*	> 100*
F03	0,56	> 100	93,3

* Ensaios não mostraram atividade a nenhuma concentração.

Os elevados valores de IC_{50} obtidos para estes complexos não são o suficiente para determinar a sua inadequação como agentes anticancerígenos, sendo ainda necessário testá-los numa maior variedade de linhas celulares.

Num estudo citotóxico do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ feito por Schatzschneider *et. al.* [38] nas linhas celulares MCF7 (incubação a 37°C durante 72h) e HT29 (carcinoma do cólon humano; incubação a 37°C durante 42h), foram obtidos os valores de IC_{50} de $778,3 \pm 107,2 \mu\text{M}$ (MCF7) e $32,3 \pm 8,4 \mu\text{M}$ (HT29). Enquanto o valor obtido para a linha MCF7 é concordante com os resultados obtidos para os complexos em estudo (Tabela 4.2), os resultados para a linha HT29 indicam que está poderá ser uma boa opção para um futuro estudo de citotoxicidade dos complexos F01 a F03.

Um fator que possivelmente contribui para os resultados obtidos com os complexos em estudo pode estar relacionado com a elevada massa molecular dos complexos F01 e F02, que poderá contribuir para um processo de internalização celular mais lento. Assim sendo, poderá ser necessário um maior período de incubação para obter resultados mais próximos dos obtidos para o complexo F03. A internalização dos complexos pode ser acompanhada ao longo do tempo através da monitorização da sua luminescência intrínseca.

O(s) mecanismo(s) de ação biológica dos mesmos podem também ser um fator determinante: como proposto anteriormente, as propriedades fotofísicas destes complexos podem permitir que estes produzam ROS quando excitados, o que leva à morte celular por *stress* oxidativo (terapia fotodinâmica). Para testar esta proposta, é necessário repetir os ensaios biológicos com excitação dos complexos de ruténio(II) ao comprimento de onda, ou intervalo de comprimentos de onda, que englobem a transferência de carga metal-ligando. Se este tratamento se mostrar eficaz, os valores elevados de IC_{50} obtidos nos ensaios sem incidência de radiação tornam-se vantajosos, uma vez que se traduzem num aumento significativo da seletividade utilizando este método.

A luminescência emitida por estes complexos também permite localizar a zona das células e tecidos onde eles se acumulam preferencialmente. Se estes dados revelarem uma elevada seletividade para algum tipo de tecido tumoral, os baixos valores de toxicidade demonstrados a baixas concentrações abrem a possibilidade da utilização dos complexos estudados como sondas biológicas.

No seguimento deste trabalho seria também desejado realizar testes de viabilidade celular em linhas de mais rápida divisão celular, com uma taxa glicolítica mais elevada. Desta forma seria possível estudar melhor o impacto que a presença da glucose no complexo F02 tem na sua seletividade e citotoxicidade.

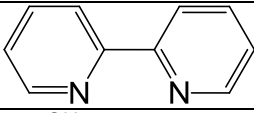
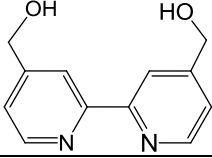
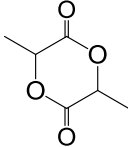
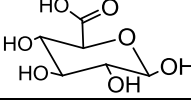
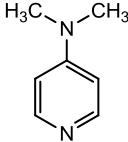
Capítulo 5 - Materiais e Métodos

5.1. Solventes e reagentes

Na Tabela 5.1 encontram-se listados os reagentes utilizados no decorrer deste trabalho, enquanto na Tabela 5.2 se encontram os solventes. Todos os solventes usados em recristalizações foram previamente sujeitos a purificação por destilação. Solventes usados para outros fins que também tenham sido purificados estão especificados como tal nos procedimentos.

Usou-se água Millipore® para preparar todas as soluções aquosas, nomeadamente as soluções de HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico), com pH = 7,4 e concentração de 10 mM. O DMEM (Biowest) utilizado contém glutamina estável e piruvato de sódio.

Tabela 5.1: Lista de reagentes usados no decorrer deste trabalho.

Reagentes (CAS)	Estrutura	Marca	Pureza/ purificação adicional	Massa Molar /g.mol ⁻¹
Cloreto de Ruténio(III) hidratado (14898-67-0)	$\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	ALDRICH	99,98%	207,43 (anidro)
2,2'-Bipiridina (366-18-7)		Alfa Aesar	99+%	156,19
4,4'-Bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina (109073-77-0)		Carbosynth	97+% Seco a vácuo.	216,24
Triflato de Prata (2923-28-6)	$\text{F}_3\text{C}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{OAg}$	ALDRICH	≥99%	256,94
<i>D,L</i> -Lactídeo (95-96-5)		Aldrich Chemistry	Recristalizado 3 vezes em tolueno, e seco a vácuo.	144,13
Ácido <i>D</i> -Glucurónico (6556-12-3)		SIGMA	≥98%	194,14
4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (1122-58-3)		Fluka	≥98,0%	122,17

Cloreto de lítio (7447-41-8)	LiCl	SIGMA-ALDRICH®	≥99%	42,39
Albumina Humana (HSA) (70024-90-7)	-	SIGMA	96-99%	~67000

Tabela 5.2: Lista de solventes usados no decorrer deste trabalho.

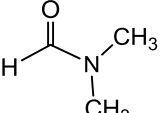

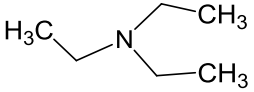
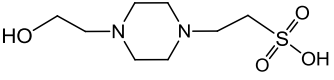

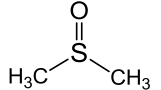
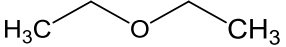
Solventes	Estrutura	Marca	Pureza/ purificação adicional	Massa Molar /g.mol ⁻¹
Dimetilformamida (DMF) (68-12-2)		Carlo Erba	≥99,9% Purificado por destilação.	73,09
Tetrahidrofurano (THF) (109-99-9)		Carlo Erba	≥99,9%	72,11 (anidro)
Trietilamina (TEA) (121-44-8)		Carlo Erba	≥99,5%	101,19
HEPES (Ácido 4-(2- hidroxietil)-1- piperazineetanosulfônico) (7365-45-9)		SIGMA	≥99,5%	238,30
Acetona (67-64-1)		LabChem	100%	58,08
Diclorometano (75-09-2)	CH ₂ Cl ₂	LabChem	≥99,8% Purificado por destilação.	84,93
Dimetil Sulfóxido (67-68-5)		SIGMA	≥99,5%	78,13
Acetonitrilo (75-05-8)	CH ₃ CN	SIGMA	99,8%	41,05
Metanol (67-56-1)	CH ₃ OH	Fisher Scientific	99,99%	32,04
Hexano (110-54-3)	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	Carlo Erba	99%	86,18
Éter Dietílico (60-29-7)		SIGMA-ALDRICH®	≥99,8%	74,12

Tabela 5.3: Lista dos solventes deuterados usados em RMN.

Solventes	Marca	Pureza	Massa Molar /g.mol ⁻¹
Clorofórmio-d	Aldrich	99,8%	120,38
Dimetil Sulfóxido -d ₆	Euriso-Top®	99,8%	84,17
Acetonitrilo-d ₃	CIL	99,8%	44,07
Acetona-d ₆	Euriso-Top®	99,8%	64,08

5.2. Instrumentação e técnicas de caracterização e análise

5.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Todos os espectros de RMN foram feitos num espectrofotômetro Bruker Avance 400 MHz à temperatura ambiente, calibrados em relação ao sinal residual de cada solvente. Os solventes deuterados utilizados foram dimetilsulfóxido-d₆ (99,8%; Euriso-top[®]), acetonitrilo-d₃ (99,8%; CIL) e clorofórmio-d (99,8%; ALDRICH), sem purificação adicional. Foi também utilizada acetona-d₆ (99,8%; Euriso-top[®]) purificada por destilação. Os desvios químicos são expressos em ppm (ou parte por milhão). [82] As multiplicidades foram identificadas como s (singuleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete) e comp (sinal complexo), sendo que este último é utilizado para identificar um sinal que pertence a prótons quimicamente não equivalentes. Foram efetuadas experiências de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HMBC e HSQC.

5.2.2. Espectroscopia Eletrônica

A espectroscopia de UV-Visível foi utilizada como técnica de caracterização dos complexos e para avaliar a sua reatividade e estabilidade em solução.

Os espectros eletrônicos foram realizados num espectrofotômetro Jasco V-560 de feixe duplo, à temperatura ambiente. Utilizaram-se células de quartzo com 1 cm de percurso ótico.

Para a caracterização dos compostos sintetizados utilizaram-se os solventes DCM, DMSO, DMSO/HEPES e DMSO/DMEM. O varrimento foi efetuado entre 900 nm e o *cut-off* do solvente em causa: 233 nm (DCM) ou 268 nm (DMSO). [57] As soluções DMSO/DMEM foram filtradas com seringas contendo um filtro com diâmetro de 25 mm e poros de 0,45 µm (Filter-Lab[®]).

Os estudos de estabilidade foram efetuados monitorizando em diferentes condições a evolução do espectro eletrónico de cada complexo ao longo do tempo. A solução tampão de HEPES foi previamente preparada dissolvendo HEPES comercial (M=238,30 g/mol, n=0,005 mol, m=1,1915g) em 500 mL de água Millipore[®]. O pH da solução foi ajustado a pH= 7,4 (por adição gota-a-gota de soluções de KOH e HCl, 4M).

A estabilidade dos complexos foi avaliada ao longo de 24 horas em 3 solventes: DMSO, DMSO/HEPES e DMSO/DMEM, sendo que nas duas últimas a quantidade de DMSO nas soluções foi de 1% (F01 e F02 em DMSO/HEPES), 2% (F03 em DMSO/HEPES e DMSO/DMEM) ou 5% (F01 e F02 em DMSO/DMEM) (v/v).

Para estes ensaios, traçaram-se espectros para a solução do composto em estudo a intervalos de tempo regulares: as soluções foram acompanhadas em intervalos de cerca de 5 minutos durante meia hora após o tempo de dissolução (tempo zero, t_{mix}), de 10 ou 15 minutos até 2 horas e em intervalos de 30 minutos até atingir as 6/7 horas de estudo. Uma última leitura foi feita a cerca de 24h após a dissolução.

A variação relativa da intensidade do espectro foi calculada de acordo com a equação 5.1 a um determinado λ de interesse, onde $Abs_{t_{mix}}$ é a absorvância da primeira medição e Abs_{t_i} são as absorvâncias a cada tempo i de medição (para o mesmo valor de λ):

$$Variação (\%) = \frac{(Abs_{t_i} - Abs_{t_{mix}})}{Abs_{t_{mix}}} \times 100 \quad (5.1)$$

5.2.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Foi utilizado um espectrofotômetro *Shimadzu IRAffinity-1 FTIR* para traçar os espectros de FTIR para todos os complexos. As amostras foram analisadas no estado sólido sob a forma de pastilhas de KBr (previamente seco numa estufa a 110°C) e todo o processo foi feito ao ar. A linha de base foi feita com uma pastilha de KBr.

5.2.4. Espectroscopia de Emissão (Fluorescência/Fosforescência)

Esta técnica foi utilizada como uma técnica de caracterização dos complexos sintetizados e como uma técnica para a avaliação da sua interação com moléculas biológicas, nomeadamente da interação dos compostos com a albumina humana. Utilizou-se um espectrofluorímetro Spex FL-1057 Tau 3 (de Horiba Jobin Yvon), com uma lâmpada Xenon de 450W como fonte de luz.

Para a caracterização dos complexos efetuaram-se medidas de fluorescência em estado estacionário e resolvidas no tempo, à temperatura ambiente.

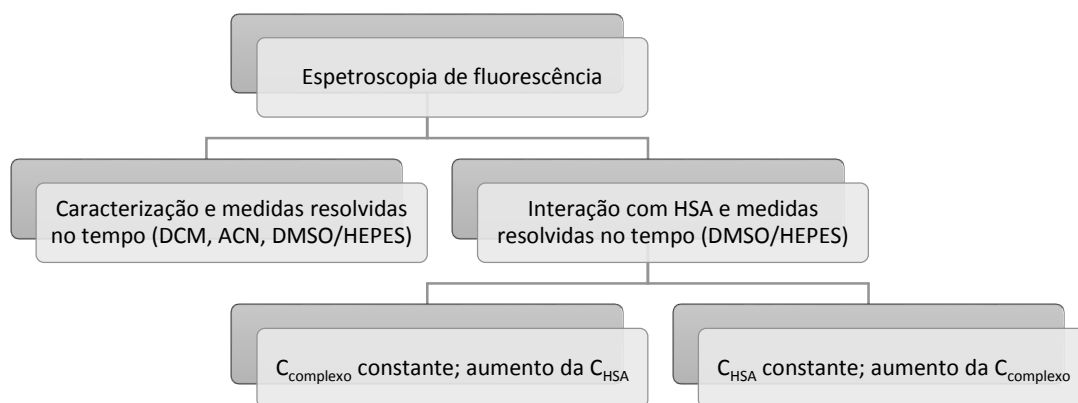


Figura 5.1: Esquema simplificado dos ensaios por espectroscopia de emissão.

A emissão dos complexos foi adquirida nos solventes DCM, ACN, e em DMSO(2%)/HEPES, usando concentrações de complexo entre 2,5 e 10 μM . Obtiveram-se os espectros de emissão com excitação das soluções de complexo a vários comprimentos de onda (Tabela 3.6, secção 3.2.4), nomeadamente 290 nm (correspondente a transições eletrónicas atribuídas à bipyridina coordenada), a 430-435 e a 455 nm (correspondentes à banda de MLCT dos complexos). As aberturas de fenda de excitação/emissão foram de 4/4 nm e utilizaram-se *cuvettes* de quartzo Suprasil® de volume reduzido e percurso ótico de 1 cm. As amostras foram corrigidas para o efeito de filtro interno e reabsorção usando os espectros de UV-Vis obtidos para cada amostra num espectrofotómetro JASCO V-560, através das equações 5.4 e 5.5, exibidas mais abaixo.

Os espectros de emissão utilizados para a caracterização dos complexos em DCM e ACN foram traçados entre $(\lambda_{\text{exc}} + 15)$ nm (para evitar a saturação do detetor com a luz de excitação), e 650 nm (limite do detetor utilizado). Nos ensaios em DMSO/HEPES a intensidade de emissão foi recolhida entre 500-650 nm para observar a emissão do complexo ($\lambda_{\text{exc}} = 455$ nm) e entre 310-500 nm para determinar se os complexos teriam emissão residual na gama de comprimentos de onda onde seria posteriormente seguida a fluorescência intrínseca da albumina.

As medidas de emissão resolvida no tempo efectuaram-se através da técnica de cronometragem de um fóton único (TCSPC), usando como fonte de luz um nanoLED N-460 nm (Horiba Jobin Yvon) para excitar os complexos a 460 nm, sendo o $\lambda_{\text{emissão}}$ de 630 nm. Usou-se Ludox® (Sigma-Aldrich) como agente dispersante (*scatter*) para obter a resposta instrumental, e uma largura de fenda entre os 10 e os 15 nm, dependendo da amostra. Estas medidas foram efectuadas em DMSO(2%)/HEPES para todos os complexos, usando concentrações entre 4,36 e 5,17 μM e um banho termostático (Colora WK14) à temperatura de $(25 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. As curvas de decaimento de emissão obtidas foram analisadas recorrendo ao programa de processamento de dados TRFA (versão 1.4, Minsk, Belarus). A equação 5.2 descreve o ajuste de um decaimento multi-exponencial com n componentes:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (5.2)$$

onde α_i e τ_i são a amplitude normalizada à unidade e tempo de vida do componente i , respetivamente. [1], [62], [83], [84] O número de componentes exponenciais utilizados depende da complexidade do decaimento, e é escolhido de acordo com a qualidade do ajuste, que é avaliada pelo valor de χ^2 (tão próximo de 1 quanto possível) e pela análise dos resíduos do ajuste (que se pretende ser uma distribuição aleatória). No caso dos complexos em estudo, o ajuste foi feito com uma só função exponencial, por ser o número mínimo de exponenciais com um valor de χ^2 adequado (Tabela 3.6).

Utilizando os parâmetros do ajuste anterior (equação 5.2) e a contribuição fracionada de cada componente i , (f_i , sendo $\sum_{i=1}^n f_i = 1$) é possível calcular o tempo de vida médio do estado excitado, que pode ser definido como o tempo médio em que a espécie emissiva (neste caso o complexo) permanece no estado excitado após a excitação pelo pulso de luz, e é dado pela equação 5.3 ($\langle \tau \rangle_f$). No entanto, o tempo de vida médio de fluorescência ($\langle \tau \rangle_a$ ou $\bar{\tau}$; equação 5.4), pode também ser obtido usando as amplitudes, em que $\alpha_i = \alpha_i / \sum_{i=1}^n \alpha_i$ e $\sum_{i=1}^n \alpha_i = 1$. O valor obtido pela equação 5.4 é proporcional ao rendimento quântico de fluorescência na ausência de extinção de fluorescência estática, e é proporcional à intensidade de fluorescência em estado estacionário.

$$\langle \tau \rangle_f = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \tau_i \quad (5.3)$$

$$\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i \quad (5.4)$$

Neste trabalho, os valores de tempo de vida apresentados na Tabela 3.6 correspondem aos valores de $\bar{\tau}$ que, para o ajuste com uma função exponencial, são numericamente iguais a $\langle \tau \rangle_f$.

Para os ensaios de interação com a albumina sérica humana, efetuados exclusivamente em DMSO(2%)/HEPES, utilizaram-se os equipamentos já descritos. Uma vez que a proteína e os complexos têm emissão intrínseca em zonas espectrais diferentes, foi possível monitorizar esta interação considerando a proteína como fluoróforo, ou o complexo em estudo como a espécie emissiva. Nesse sentido, foram realizados dois tipos de experiências: um no qual se manteve constante a concentração de albumina e se variou a do complexo, e outro no qual se fez o inverso.

A solução-stock de albumina foi preparada por dissolução da proteína em tampão HEPES (10 mM, pH=7,4), com agitação suave, deixando a proteína hidratar até se obter uma solução homogénea (durante cerca de 30-45 minutos). A concentração desta solução-stock foi então aferida por UV-Visível utilizando para a absorvidade molar da albumina a 280 nm o valor de $\epsilon = 36850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. [1]

Prepararam-se várias soluções com concentração de albumina constante (5 μM) e concentração de complexo variável, numa razão molar de albumina:complexo de 1:0 até 1:5. Foram também preparadas as respetivas soluções de brancos contendo apenas complexo, entre a razão molar albumina:complexo de 0:0 (apenas solvente) e 0:5. Um esquema do planeamento destas soluções e brancos pode ser consultado no Anexo 19. Um planeamento semelhante foi feito para as experiências onde se manteve a concentração de complexo constante, variando a da albumina. As soluções foram incubadas a 37°C durante tempo suficiente para garantir que o equilíbrio fosse atingido antes de se procederem às medidas de intensidade de emissão. Também nestas experiências foram feitas medições resolvidas no tempo, tanto para a solução zero (S0) contendo apenas o fluoróforo como para algumas das outras soluções contendo o fluoróforo e diferentes concentrações de *quencher*.

Adicionalmente foi necessário considerar as limitações deste tipo de experiências. Uma delas surge com o aumento da absorvância total da solução, que leva a que haja menor penetração da radiação incidente, o que também diminui a intensidade de luz que chega ao detetor. Este problema pode-se tornar significativo com o aumento da concentração da espécie absorvente. [85] Este efeito, que se designa por *efeito de filtro interno*, pode ser corrigido recorrendo à equação 5.5, onde Abs_{S0} corresponde à absorção do espectro eletrónico para a solução contendo apenas o fluoróforo (S0), e Abs_{Si} corresponde à absorção do espectro eletrónico para as soluções *i* contendo fluoróforo e *quencher*.

A outra limitação ocorre quando uma espécie absorve luz na zona espectral onde se está a medir a fluorescência de outra espécie. Quando isto acontece, especialmente em amostras com maior concentração da espécie que absorve, parte da radiação que a amostra em estudo emite é reabsorvida antes de poder chegar ao detetor. [85] Chama-se a este efeito *reabsorção*, e pode ser corrigido através da equação 5.6.

$$FC1 = Abs_{Si} \times \frac{1 - 10^{-Abs_{S0}}}{Abs_{S0} \times (1 - 10^{-Abs_{Si}})} \quad (5.5)$$

$$FC2 = \ln 10 \times \frac{Abs_{Si}}{1 - 10^{-Abs_{Si}}} \quad (5.6)$$

O produto entre o fator de correção FC1 (calculado com a absorção ao $\lambda_{\text{máx}}$) e o FC2 (calculado para todos os c.d.o. do espectro eletrônico) dá origem ao fator de correção FC (para todos os c.d.o.), que é então multiplicado pelos valores I_f do espectro de emissão de fluorescência.

Em fluorescência, o termo *quenching* (ou extinção de fluorescência) utiliza-se para descrever um processo que resulta na diminuição da intensidade de fluorescência de uma espécie emissiva (ou fluoróforo) em solução. Este processo pode ser desencadeado pela interação entre duas espécies, o fluoróforo e um *quencher*, sendo este último a espécie que provoca a diminuição dessa intensidade. [62]

Com estas experiências de interação dos complexos com HSA foi possível seguir a evolução da intensidade da fluorescência da proteína ao λ de emissão máxima. Esta extinção de fluorescência resulta da interação entre as duas espécies em solução, quer por interações eletrostáticas (extinção dinâmica, ou colisão) quer por formação de complexo não emissivo (extinção estática). [62] No processo de extinção dinâmica o *quencher* difunde-se com o fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado e, quando entram em contacto, o fluoróforo volta ao estado fundamental sem emissão de fotão. No processo de extinção estática forma-se um complexo entre ambas espécies que não é fluorescente. [62]

Na Figura 5.2 encontra-se um gráfico exemplificativo de duas curvas de Stern-Volmer típicas de cada mecanismo. A curva a verde representa I_{f0}/I_f com o aumento da concentração de *quencher* [Q], onde I_{f0} e I_f são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de *quencher*, respetivamente. A reta a tracejado corresponde a uma representação semelhante para o tempo de vida do estado excitado, em que τ_0 e τ são os tempos de vida do fluoróforo na ausência e na presença de *quencher* respetivamente. [62]

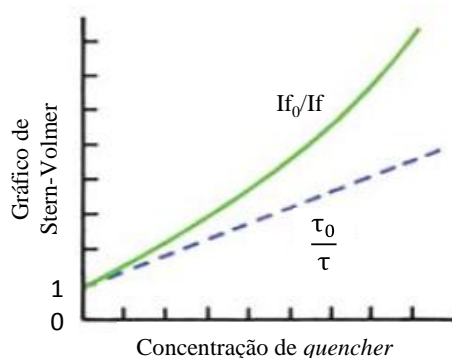


Figura 5.2: Gráfico de Stern-Volmer de emissão em estado estacionário I_{f0}/I_f (linha a verde) ou resolvida no tempo, τ_0/τ com [Q] (tracejado a azul) para um processo de extinção de fluorescência por mecanismos estático e dinâmico em simultâneo. [62]

Avaliando a evolução de I_{f0}/I_f e de τ_0/τ com o aumento da concentração de *quencher* é possível determinar se o mecanismo de extinção de fluorescência é por *quenching* estático e dinâmico

simultaneamente, como no exemplo acima, ou se o *quenching* ocorre apenas por um dos mecanismos, caso em que ambas as relações seriam lineares e teriam declives semelhantes.

5.2.5. Voltametria Cíclica

Os complexos F01 e F02 foram sujeitos a estudos eletroquímicos no Instituto Superior Técnico (IST) utilizando um potencióstato/galvanostato *EG&G Princeton Applied Research Model 273^a* e o software Electrochemistry PowerSuite v 2.51. Os solventes utilizados foram o diclorometano e o acetonitrilo, e o eletrólito de suporte foi o hexafluorofosfato de tetrabutílamónio (NBu₄PF₆) (0,1 M para acetonitrilo e 0,2 M para o diclorometano). A célula utilizada é constituída por 3 eléctrodos: eléctrodo de trabalho de disco de platina (1 mm de diâmetro), eléctrodo de referência (pseudo-eléctrodo) fio de prata e um eléctrodo auxiliar (contra-eléctrodo) de fio de platina.

Os potenciais redox dos complexos foram medidos na presença de ferroceno como padrão interno, sendo os seus valores sido relacionados com o Eléctrodo Saturado de Calomelanos (SCE) usando o potencial do par redox ferricínio/ferroceno ($E_{p/2} = 0.40 \text{ V vs. SCE}$ para CH₃CN e 0.46 V para CH₂Cl₂). [86]

Os estudos foram realizados em atmosfera inerte e à temperatura ambiente, sob a supervisão da Professora Paula Robalo.

5.2.6. Análise Elementar

As determinações das percentagens de C, H, N e S para o complexo F03 foram realizadas num equipamento Fisons Instruments, modelo EA1108, no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico.

5.3. Métodos experimentais de síntese

5.3.1. Síntese do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]

Esta síntese foi realizada com base no trabalho de Sullivan *et. al.* [49] com modificações. [50]

Num *Schlenk* sob atmosfera inerte foram colocadas 0,6263g (3mmol) de RuCl₃·3H₂O comercial, 0,9414g (6mmol) de 2,2'-bipiridina (bpy) e 0,4300g (10,14mmol) de LiCl. De seguida foram

adicionados 10 mL de dimetilformamida (DMF) seca e iniciou-se o refluxo sob agitação e fluxo de azoto. No final desse tempo, a solução foi deixada a arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida evaporou-se cerca de metade do DMF para se adicionarem 35mL de acetona. A solução foi agitada vigorosamente e deixada em repouso a 4°C até ao dia seguinte.

Formou-se um precipitado roxo, e nas paredes do vaso reacional um sólido de tonalidade mais amarelada. Evaporou-se toda a acetona e cerca de metade do DMF, para de seguida se fazerem 5 adições (10mL cada) de uma solução 1:1 de diclorometano (DCM) e acetona, concentrando sempre a solução entre adições.

Seguidamente foram feitas 3 lavagens com água destilada fria (10mL cada) e 3 com éter dietílico frio (10 mL cada). A água sobrenadante filtrada apresentava uma tonalidade cor-de-laranja.

O produto final foi obtido sob a forma de um sólido amorfo roxo muito escuro, com um rendimento de 28,3%. O espectro de ^1H -RMN deste complexo disponível no Anexo 1 permitiu confirmar o sucesso desta síntese, por comparação com espectros existentes na bibliografia.

^1H -RMN [DMSO- d_6 , Me_4Si , δ /ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 9,954 (d, 2H, H6b), 8,629 (d, 2H, H3b), 8,472 (d, 2H, H3a), 8,061 (t, 2H, H4b), 7,766 (t, 2H, H5b), 7,674 t, 2H, H4a), 7,506 d, 2H, H6a), 7,096 (t, 2H, H5a).

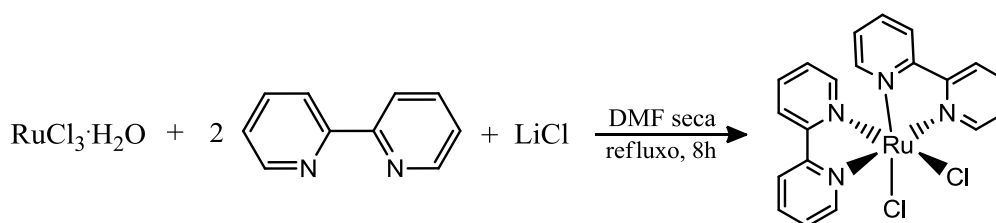


Figura 5.3: Esquema reacional da síntese do precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$.

5.3.2. Síntese do macroligando Bpy-PLA

Num *Schlenk* de tamanho pequeno e em atmosfera inerte foram colocadas 1,0036 g (6,963 mmol) de D,L-Lactídeo, 0,0756 g (0,350 mmol) de 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina ($\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$), e 0,0575 g (0,471 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), desarejando sempre entre cada adição.

A solução foi aquecida em banho de óleo a 135 °C, e deixada a reagir em *bulk* durante 15 minutos. Ao fim deste tempo foi retirada do banho de óleo para se lhe adicionar algumas gotas de uma solução previamente preparada de 50 mL de água/metanol (1:1), com a finalidade de fazer o *quench* da reação, ou seja, para interromper a reação funcionalizando a extremidade do polímero com um grupo hidroxilo.

De seguida o polímero foi dissolvido em pequenas quantidades de diclorometano com ajuda de ultrassons, para ser transferido para o balão com a restante solução de água/metanol, após o que se deixou sob agitação durante 10 minutos, sendo em seguida parcialmente evaporada no evaporador rotativo.

Depois de todo o polímero aderir às paredes do balão, decantou-se a solução sobrenadante, e o polímero foi lavado 3 vezes com éter dietílico. Procedeu-se, por fim, á secagem por vácuo, pelo que se obteve um sólido branco. O rendimento desta reação foi de 88,7%.

¹H-RMN [acetonitrilo-d₃, Me₄Si, δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 8,658 (d, 2H, H6), 8,392 (s, 2H, H3), 7,361 (d, 2H, H5), 5,284 (s, 4H, H7), 5,151 (m, 40H, H8), 4,274 (q, 2H, H8'), 1,501 (m, 100H, H9).

5.3.3. Síntese do macroligando Bpy-PLA-Gluc

No balão de 100 mL que contém o polímero bpy-PLA (o mesmo no qual ele aderiu durante a sua síntese), foram colocados 50 mL de THF (tetrahidrofurano) seco, e 0,102 mL de TEA (trietilamina) seca. Esse valor de volume advém de ser necessário utilizar uma relação de TEA para o polímero de 2,5:1, respetivamente. A solução ficou sob agitação sob fluxo de azoto durante 40 minutos.

Ao fim desse tempo, foram adicionados 0,1417 g (0,73 mmol) de ácido *D*-glucurónico (Gluc) e adaptou-se o balão numa montagem de Dean-Stark. Foi iniciado o aquecimento da solução em óleo até serem recolhidos 45 mL de THF para um Erlenmeyer. O restante solvente no balão foi evaporado, e o produto final lavado 3 vezes com éter dietílico. O rendimento desta reação foi 92,3%.

¹H-RMN [clorofórmio-d, Me₄Si, δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 8,768 (s, 2H, H6), 8,612 (s, 2H, H3), 7,442 (s, 2H, H5), 5,338 (s, 4H, H7), 5,165 (m, 40H, H8), 4,357 (m, 2H, H8').

5.3.4. Síntese do complexo F01: [Ru(bpy)₂(bpy-PLA)][CF₃SO₃]₂

Num *Schlenk* foram dissolvidas 0,1457 g (0,3 mmol) do complexo precursor [Ru(bpy)₂Cl₂] em 20 mL de acetona. Com o protegido da luz e com atmosfera inerte, foram adicionadas 0,1577 g (0,6 mmol) de AgCF₃SO₃. A solução foi deixada em agitação durante 1h, ao fim da qual foram adicionadas 0,7259 g (0,24 mmol) do ligando bpy-PLA. Seguiu-se um período de refluxo que durou cerca de 4h35.

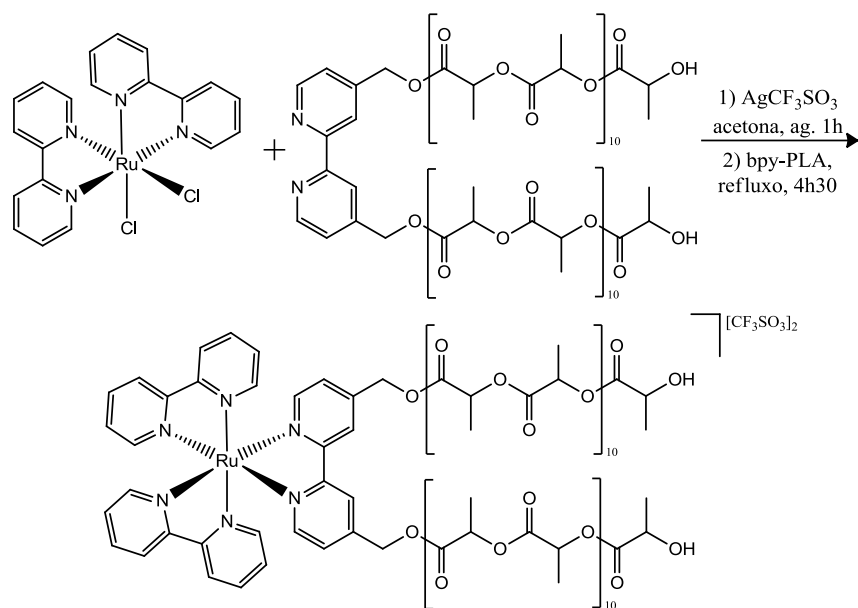


Figura 5.4: Esquema reacional da síntese do complexo F01, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.

A solução que inicialmente era roxa tornou-se vermelha enquanto decorria a reação e, no fim desta, o sobrenadante encontrava-se vermelho alaranjado escuro, com precipitado branco de AgCl depositado no fundo. O sobrenadante foi então filtrado e evaporado à secura. A recristalização por difusão lenta foi feita por dissolução do produto em DCM e adição de hexano. O produto final foi um sólido cor-de-laranja, e o rendimento da reação foi de 71,7%.

^1H -RMN [CDCl_3 , Me_4Si , δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 8,482 (s.c., 6H, $\text{H}_3+\text{H}_3'$), 8,026 (t, 4H, H_4'), 7,799 (s, 2H, H_6'), 7,740 (s.c., 4H, $\text{H}_6+\text{H}_6'$), 7,497 (m, 4H, H_5'), 7,395 (m, 2H, H_5), 5,381 (m, 4H, H_7), 5,146 (m, 40H, H_8), 4,358 (m, 2H, H_8'), 1,555 (m, 120H, $\text{H}_9+\text{H}_9'$). **^{13}C -RMN** [CDCl_3 , Me_4Si , δ/ppm (atribuição)]: 151,7 ($\text{C}_6+\text{C}_6'$), 138,2 (C_4'), 128,3 (C_5'), 125,9 (C_5), 124,4 (C_3'), 122,3 (C_3), 69,1 (C_8), 66,8 (C_{10}), 64,3 (C_7), 16,8 (C_9). **FTIR (KBr, cm^{-1})**: $\nu = 767,7$ ($\delta_{\text{C-H}}$), 1273 ($\nu_{\text{C-N}}$; CF_3SO_3^-), 1381 ($\delta_{\text{C-H}}(\text{CH}_3)$), 1630 ($\delta_{\text{C=C}}$), 1753 ($\nu_{\text{C=O}}$). **UV-Vis [DCM, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)**: 247 (27500), 255 (sh), 290 (83200), 326 (sh), 360 (sh), 394 (sh), 434 (sh), 456 (13900); **[DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)**: 292 (71800), 330 (sh), 360 (sh), 394 (sh), 434 (sh), 457 (11877).

5.3.5. Síntese do complexo F02: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$

O procedimento para esta síntese foi semelhante ao utilizado para a síntese do complexo F01: Num *Schlenk* foram dissolvidas 0,1285 g (0,27 mmol) do complexo precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ em 20 mL de acetona. Foram adicionadas 0,1365 g (0,53 mmol) de AgCF_3SO_3 . A solução foi deixada em agitação durante 1h, ao fim do qual foram adicionadas 0,7290 g (0,21 mmol) do ligando bpy-PLA-Gluc. A reação durou cerca de 3h35.

No final a solução era vermelha, com precipitado sólido branco de AgCl. Após filtração e secagem ficou um sólido cor-de-laranja amorfo no *Schlenk*. A recristalização foi feita com DCM e hexano. O rendimento da reação foi 67,1%.

¹H-RMN [CDCl₃, Me₄Si, δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 8,504 (s.c., 6H, H3+H3'), 8,028 (t, 4H, H4'), 7,783 (s, 2H, H6'), 7,724 (s.c., 4H, H6+H6'), 7,510 (t, 4H, H5'), 7,392 (m, 2H, H5), 5,382 (m, 4H, H7), 5,150 (m, 40H, H8), 4,346 (q, 2H, H8'), 1,551 (m, 120H, H9). **¹³C-RMN** [CDCl₃, Me₄Si, δ/ppm (atribuição)]: 151,6 (C6, C6'), 138,2 (C4'), 128,4 (C5+C5'), 122,3/124,4 (C3 + C3'), 69,1 (C8), 66,79 (C8'), 64,3? (C7), 16,8 (C9). **FTIR (KBr, cm⁻¹)**: ν= 769,6 (δ_{C-H}), 1275 (ν_{C-N}; CF₃SO₃⁻), 1379 (δ_{C-H}(CH₃)), 1755 (ν_{C=O}). **UV-Vis [DCM, λ_{máx}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹)]**: 247 (17200), 255 (sh), 289 (57200), 326 (sh), 360 (sh), 394 (sh), 434 (sh), 456 (9840,0); **[DMSO, λ_{máx}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹)]**: 292 (78400), 330 (sh), 360 (sh), 394 (sh), 434 (sh), 457 (15900).

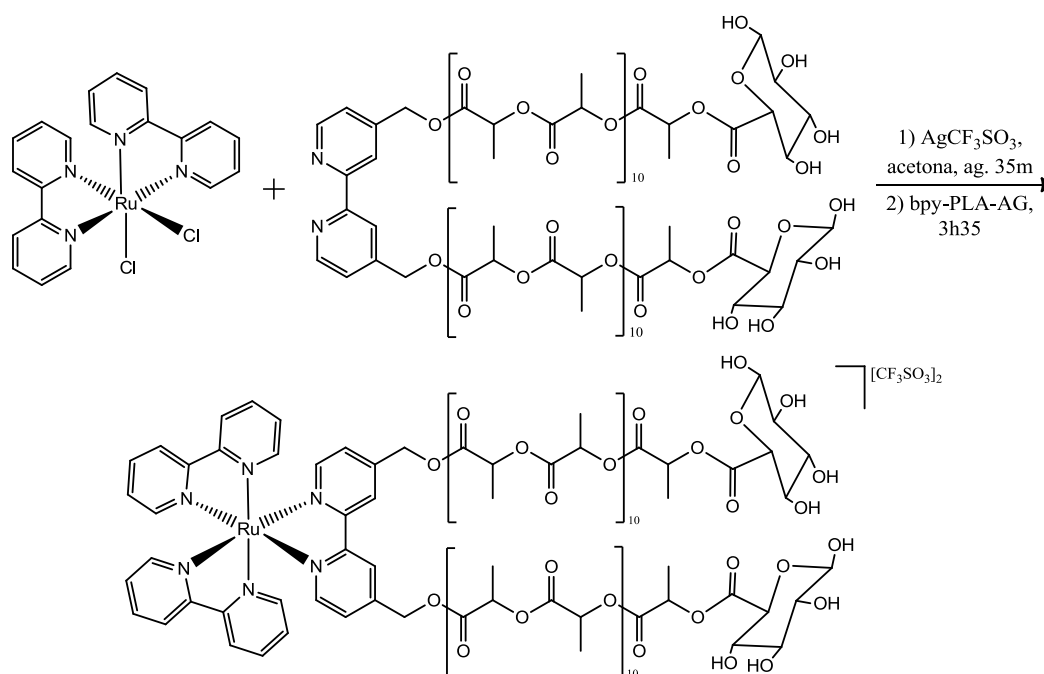


Figura 5.5: Esquema reacional da síntese do complexo F02, [Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)][CF₃SO₃]₂.

5.3.6. Síntese do complexo F03: [Ru(bpy)₂{bpy(CH₂OH)₂}] [CF₃SO₃]₂

O procedimento para esta síntese foi semelhante ao utilizado para a síntese dos complexos F01 e F02: Num *Schlenk* foram dissolvidas 0,2600 g (0,54 mmol) do complexo precursor [Ru(bpy)₂Cl₂] em 20 mL de acetona. Foram adicionadas 0,2760 g (1,07 mmol) de AgCF₃SO₃. A solução foi deixada em

agitação durante 30 min, ao fim do qual foram adicionadas 0,0944 g (0,44 mmol) do ligando $\text{bpy}(\text{CH}_2\text{OH})_2$. A reação durou cerca de 4h.

No final a solução era vermelha, com precipitado sólido branco de AgCl . Após filtração e secagem ficou um sólido cor-de-laranja amorfo no *Schlenk*. Foi feita uma purificação com DCM. O rendimento da reação foi 52,5%.

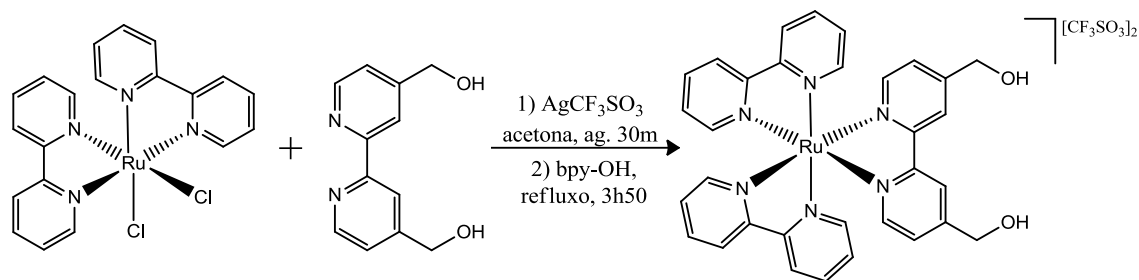


Figura 5.6: Esquema reacional da síntese do complexo F03, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{bpy}(\text{MeOH})_2][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.

^1H -RMN [DMSO, Me_4Si , δ/ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 8,841 (d, 4H, $\text{H}3'$), 8,703 (s, 2H, $\text{H}3$), 8,163 (t, 4H, $\text{H}4'$), 7,747 (t, 4H, $\text{H}6'$), 7,658 (d, 2H, $\text{H}6$), 7,530 (t, 4H, $\text{H}5'$), 7,467 (d, 2H, $\text{H}5$), 4,741 (s, 4H, $\text{H}7$). **^{13}C -RMN** [DMSO, Me_4Si , δ/ppm (atribuição)]: 156,1 ($\text{C}2+\text{C}2'$), 154,7 ($\text{C}5$), 151,3/151,1? ($\text{C}6'$), 150,7? ($\text{C}6$), 138,2 ($\text{C}4'$), 128,3 ($\text{C}5'$), 125,02 ($\text{C}4$), 124,9 ($\text{C}3'$), 121,7 ($\text{C}3$), 61,6 ($\text{C}7$). **FTIR (KBr, cm^{-1})**: $\nu = 769,6$ ($\delta_{\text{C-H}}$), 1281 ($\nu_{\text{C-N}}$; CF_3SO_3^-), 1609 ($\delta_{\text{C=C}}$). **UV-Vis [DCM, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)**]: 246 (21636), 256 (sh), 289 (69202), 327 (sh), 360 (sh), 395 (sh), 430 (sh), 457 (11877); **[DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)**]: 291 (129343), 330 (sh), 363 (sh), 400 (sh), 430 (sh), 457 (23529,5). **AE (% (elemento)) [calculado]**: 44,0 (C), 3,0 (H), 9,1 (N), 6,9 (S); **[obtido]**: 40,4 (C), 3,1 (H), 7,7 (N), 7 (S).

Capítulo 6 - Conclusões e perspectivas futuras

O cancro continua ainda a ser um campo de pesquisa muito ativo, pois apesar dos inúmeros avanços nesta área, os tratamentos existentes dão origem a efeitos secundários bastante debilitantes para os pacientes. Isto resulta da fraca seletividade dos fármacos utilizados, que atacam não só os tecidos cancerígenos como também os saudáveis. Por este motivo e pela elevada mortalidade associada a doenças oncológicas, continua a ser importante desenvolver novos compostos e otimizar a sua atividade e seletividade.

Assim, no âmbito deste trabalho foram sintetizados e caracterizados dois novos complexos de ruténio(II) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, e o complexo já conhecido $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{bpy}(\text{MeOH})_2][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (sem macroligando) com a finalidade de avaliar o seu potencial neste campo. Nesse sentido, após a purificação dos complexos, estudou-se a sua estabilidade em solução e atividade citotóxica nas linhas celulares A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, sensível à cisplatina), MCF7 (Adenocarcinoma da mama humana, hormono-dependente) e fibroblastos (células não-tumorigénicas), bem como a sua interação com moléculas biológicas de interesse, nomeadamente a albumina humana (HSA).

Os complexos foram caracterizados pelas técnicas de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC), espectroscopia eletrónica, FTIR, espectroscopia de emissão e voltametria cíclica. Não foi possível fazer análise do complexo F02 por MALDI-TOF, que daria informação relativamente à extensão da funcionalização dos grupos terminais deste complexo com os açúcares. Este poderá assim ser um estudo complementar futuro. À luz da caracterização efectuada foi possível confirmar o sucesso das sínteses, bem como averiguar as propriedades espectroscópicas e eletroquímicas dos complexos obtidos.

Os complexos sintetizados são luminescentes em meio aquoso à temperatura ambiente e o comportamento de luminescência foi estudado para cada um dos complexos. Os solventes utilizados para esta caracterização foram DCM, ACN, e DMSO(2%)/HEPES. Verificou-se consistentemente, para todos os complexos, que independentemente do comprimento de onda de excitação escolhido, a banda de emissão surge sempre na zona menos energética do espectro, com os máximos a surgir entre 608 e 639 nm. O máximo de emissão da albumina surge a cerca de 340 nm. As medições do tempo de vida do estado excitado dos complexos revelaram também que estes são fosforescentes, com valores de τ entre os 344 e os 405 ns.

Na medicina a relevância destes estudos está na possível aplicação dos complexos como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (PDT). Nesta, os complexos são excitados a um determinado c.d.o., e têm um tempo de vida relativamente longo, durante o qual transferem energia para as moléculas de oxigénio presentes no sistema biológico, criando espécies de oxigénio reativas (ROS)

que danificam os tecidos por processos oxidativos. [87] Um bom fotossensibilizador deve ser seletivo para tecidos cancerígenos, não tóxico em condições de escuridão, absorver comprimentos de onda mais longos (maior penetração em tecidos biológicos), longo tempo de emissão de fosforescência e elevado rendimento quântico. [87] Outra possível aplicação destes complexos pode ser o seu uso como sondas moleculares que permitem observar em que tecidos estes terão mais tendência a acumular-se. Se tiverem uma afinidade conhecida para um alvo específico, como um tipo de tumor, este poderá ser rastreado por um método de luminescência. Os estudos de luminescência realizados ao longo deste trabalho poderão ser complementados num futuro próximo com a determinação do seu rendimento quântico, Φ_f .

No sentido de avaliar a adequabilidade destes complexos para a aplicação pretendida, estudou-se a estabilidade dos complexos em solução, nomeadamente no solvente DMSO e em soluções de DMSO/HEPES e DMSO/DMEM. Estes testes foram importantes na medida em que precederam os testes biológicos, e a elevada estabilidade que os complexos apresentaram ao fim de 24h (entre 86,0% e 97,7%) confirmaram que os resultados obtidos nos ensaios biológicos que se seguiram correspondem ao efeito do complexo parental (ao seu comportamento real), e não ao de um produto ou produtos de degradação.

Os ensaios de interação com a albumina humana (HSA) mostraram que todos os complexos são muito eficazes na extinção da fluorescência do resíduo Trp214, indicando que os complexos se ligam à proteína (possivelmente próximo ou no sítio I, localizado no subdomínio IIA da proteína, que se encontra na proximidade deste resíduo). A ligação dos complexos à albumina é confirmada pela emissão dos complexos, tendo-se verificado que a luminescência destes últimos não só não é extinta (F03), como se intensifica no caso dos complexos com o macroligando F01 e F02. Assumindo um mecanismo de *quenching* estático foi possível determinar que essa interação moderada a forte tem com uma constante de estabilidade de $\log K_B \sim 5$ nas condições experimentais utilizadas, sugerindo que é possível serem transportados de forma eficiente no sangue por esta proteína.

Seria interessante completar esta informação com estudos da reversibilidade da ligação dos complexos com a proteína. Os resultados são de relevância biológica uma vez que podem dar uma indicação da biodisponibilidade dos compostos no organismo.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que nem o complexo F01 nem o F02 induzem morte celular a baixas concentrações nas linhas testadas. Apenas o complexo F03 exibe um valor de IC_{50} bastante favorável (0,56 μM) na linha A2780. Uma vez que estes testes foram realizados com 48 horas de incubação, e os complexos F01 e F02 são muito volumosos, poderá ser necessário mais tempo para a sua internalização nas células.

Futuramente, seria de grande interesse complementar os estudos de citotoxicidade destes complexos, testando-os nas mesmas linhas celulares com um maior período de incubação. Em fases

seguintes seria também testar a viabilidade celular, mas desta vez com excitação dos complexos após o período de incubação, de modo a averiguar se este procedimento lhes confere maior citotoxicidade.

Poderá ser eventualmente possível seguir o processo de internalização dos complexos, graças à sua luminescência intrínseca. Estes testes permitem observar em que zonas das células os complexos têm maior tendência a acumular-se, bem como o tempo que ficam lá retidos. Para estes ensaios poderiam ser utilizadas linhas celulares com maior consumo de açúcares e outras com menor consumo, de modo a comparar as diferenças de acumulação do complexo F02, funcionalizado com ácido *D*-glucurónico, relativamente à acumulação dos complexos F01 e F03.

Em suma, este trabalho resultou na síntese de três complexos, dois deles novos, com bastante potencial no tratamento de tumores, e possibilidade de utilização como sondas biológicas. As suas propriedades luminescentes e as aplicações que daí podem resultar, tornam a continuação do seu estudo de elevado interesse, pelo que se pode concluir que este projeto foi concluído com êxito.

Bibliografia

- [1] B. Demoro, R. F. M. Almeida, F. Marques, C. P. Matos, L. Otero, J. C. Pessoa, I. Santos, Rodríguez, A. Rodríguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino e A. I. Tomaz, "Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism.," *Dalton Trans.*, vol. 42, pp. 7131-7146, 2013.
- [2] "World Health Organization," February 2015. Available Online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. [Acedido em 19-08-2016].
- [3] A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler e G. Sava, "In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 104, pp. 79-86, 2010.
- [4] A. H. Partridge, H. J. Burstein e E. P. Winer, "Side effects of chemotherapy and combines chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer.," *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, vol. 30, pp. 135-142, 2001.
- [5] A. Valente e H. M. Garcia, "Synthesis of macromolecular ruthenium compounds: a new approach for the search of anticancer drugs.," *Inorganics*, vol. 2, pp. 96-114, 2014.
- [6] M. Peyrone, "Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür, Ann. Chem. Pharm., 1844, 51,1; traduzido por Dr. Sheridan Muspratt como "Action of Ammonia upon the Protochloride of Platinum", Med. Times, 1844, 10, 381.".
- [7] G. B. Kauffman, R. Pentimalli, S. Doldi e M. D. Hall, "Michele Peyrone (1813-1883), Discover of Cisplatin.," *Platinum Metals Rev.*, vol. 54, pp. 250-256, 2010.
- [8] F. Trudu, F. Amato, P. Vañhara, T. Pivetta, E. M. Peña-Méndez e J. Havel, "Coordination compounds in cancer: past, present and prespectives.," *J. Applied Biomed.*, vol. 13, pp. 79-103, 2015.
- [9] A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen e G. Sava, "Approaching tumor therapy beyond platinum drugs: Status of the art and prespectives of ruthenium drug candidates," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 106, pp. 90-99, 2012.
- [10] M. M. Gottesman, "Mechanisms of cancer drug resistance," *Annu. Rev. Med.* , vol. 53, pp. 615-27, 2002.

-
- [11] L. Kelland, "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, pp. 573-584, 2007.
- [12] M. J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder e A. D. Kelman, "Reduction and subsequent binding of ruthenium ions catalyzed by subcellular components," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 12, pp. 79-87, 1980.
- [13] W. M. Motswainyana e P. A. Ajibade, "Anticancer activities of mononuclear ruthenium(II) coordination complexes," *Hindawi Publ. Corp.*, vol. 2015, pp. 1-21, 2015.
- [14] J. C. Pessoa e I. Tomaz, "Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components.," *Current Med. Chem.*, vol. 17, pp. 3701-3738, 2010.
- [15] M. S. Wheby e L. G. Jones, "Role of transferrin in iron absorption.," *J. Clinical Invest.*, vol. 42, pp. 1007-1016, 1963.
- [16] S. Kapitza, M. A. Jakupc, M. Uhl, B. K. Keppler e B. Marian, "The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells.," *Cancer Lett.*, vol. 226, pp. 115-121, 2005.
- [17] E. S. Antonarakis e A. Emadi, "Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?," *Cancer Chem. Pharm.*, vol. 66, pp. 1-9, 2010.
- [18] C. S. Allardyce e P. J. Dyson, "Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects.," *Platinum Metals Rev.*, vol. 45, pp. 62-69, 2001.
- [19] P. Govender, A. K. Renfrew, C. M. Clavel, P. J. Dyson, B. Therrien e G. S. Smith, "Antiproliferative activity of chelating N,O- and N,N-ruthenium(II) arene functionalised poly(propyleneimine) dendrimer scaffolds.," *Dalton Trans.*, vol. 40, pp. 1158-1167, 2011.
- [20] F. Frausin, V. Scarcia, M. Cocchietto, A. Furlani, B. Serli, E. Alessio e G. Sava, "Free exchange across cells, and echistatin-sensitive membrane target for the metastasis inhibitor NAMI-A (imidazolium trans-imidazole dimethyl sulfoxide tetrachlororuthenate) on KB tumor cells," *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 313, pp. 227-233, 2005.
- [21] S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. v. Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. H. Beijnen e J. H. M. Schelles, "Phase I/II study with ruthenoim compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy.," *Inv. New Drugs*, vol. 33, pp. 201-214, 2015.
-

-
- [22] C. Casarsa, M. T. Mischis e G. Sava, "TGFb1 regulation and collagen-release-independent connective tissue re-modelling by the ruthenium complex NAMI-A in solid tumours," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 98, pp. 1648-1654, 2004.
- [23] R. E. Morris, R. E. Aird, P. d. S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell e P. J. Sadler, "Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes," *J. Med. Chem.*, vol. 44, pp. 3616-3621, 2001.
- [24] A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. Almeida, F. Mendes, É. A. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss e M. H. Garcia, "[Ru^{II}(η^5 -C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]⁺, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 117, pp. 261-269, 2012.
- [25] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava e P. J. Dyson, "In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes," *J. Med. Chem.*, vol. 48, pp. 4161-4171, 2005.
- [26] R. Foster, D. Cole, S. Mead, P. Sadler e K. Grimshaw, "AACR Publications; Cancer Research," American Association for Cancer Research, 13-9-2009. Available Online: http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/9_Supplement/889. [Acedido em 2016].
- [27] "Everything Maths and Science," [Online]. Available: <http://www.everythingmaths.co.za/science/lifesciences/grade-10/03-cell-division/03-cell-division-02.cnxmlplus>. [Acedido em 22-8-2016].
- [28] A. Valente, M. H. Garcia, F. Marques, Y. Miao, C. Rousseau e P. Zinck, "First polymer "ruthenium-cyclopentadienyl" complex as potential anticancer agent," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 127, pp. 79-81, 2013.
- [29] V. Moreno, M. Font-Bardia, T. Calvet, J. Lorenzo, F. X. Avilés, M. H. Garcia, T. S. Morais, A. Valente e M. P. Robalo, "DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, pp. 241-249, 2011.
- [30] B. A. Gibson, Y. Zhang, H. Jiang, K. M. Hussey, J. H. Shrimp, H. Lin, F. Schewede, Y. Yu e W. L. Kraus, "Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation," *Science*, pp. 1-12, 2016.
- [31] H. L. Ko e E. C. Ren, "Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription," *Biomol.*, vol. 2, pp. 524-548, 2012.
-

-
- [32] Y. Matsumura e H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.," *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 6387-6392, 1986.
- [33] O. Warburg, F. Wind e E. Necelein, "The metabolism of tumors in the body.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 8, pp. 519-530, 1927.
- [34] K. C. Carvalho, I. W. Cunha, R. M. Rocha, F. R. Ayala, M. M. Cajaíba, M. D. Begnami, R. S. Vilela, G. R. Paiva, R. G. Andrade e F. A. Soares, "GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker.," *Clinics*, vol. 66, pp. 965-972, 2011.
- [35] E. C. Calvaresi e P. J. Hergenrother, "Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer.," *Chem. Sci.*, vol. 4, pp. 2319-2333, 2013.
- [36] M. O. Santiago, C. L. D. Filho, I. S. Moreira, R. M. Carlos, S. L. Queiroz e A. A. Batista, "Photochemical isomerization of *trans*- to *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-X₂-2,2'-bipy)] (X=H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, -O=SMe, -Cl, -OMe) complexes.," *Polyhedron*, vol. 22, pp. 3205-3211, 2003.
- [37] S. Schäfer, I. Ott, R. Gust e W. S. Sheldrick, "Influence of the polypyridyl (pp) ligand size on the DNA binding properties, cytotoxicity and cellular uptake of organoruthenium(II) complexes of the type $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{L})(\text{pp})]^{\text{n}+}$ [L = Cl, n = 1; L = (NH₂)₂CS, n = 2].," *Eur. J. Inorg. Chem.*, pp. 3034-3046, 2007.
- [38] U. Schatzschneider, J. Niesel, I. Ott, R. Gust, H. Alborzinia e S. Wölfl, "Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes [Ru(bpy)₂(N-N)]Cl₂ with N-N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn.," *Chem. Med. Chem.*, vol. 3, p. 1104 – 1109, 2008.
- [39] C. Tan, S. Lai, S. Wu, S. Hu, L. Zhou, Y. Chen, M. Wang, Y. Zhu, W. Lian, W. Peng, L. Ji e A. Xu, "Nuclear permeable ruthenium(II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis.," *J. Med. Chem.*, vol. 53, pp. 7613-7624, 2010.
- [40] B. Peña, A. David, C. Pavani, M. S. Baptista, J.-P. Pellois, C. Turro e K. R. Dunbar, "Cytotoxicity studies of cyclometallated ruthenium(II) compounds: new applications for ruthenium dyes.," *Organometallics*, vol. 33, pp. 1100-1103, 2014.
- [41] A. Juris e V. Balzani, "Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry and chemiluminescence.," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 84, pp. 85-277, 1988.
-

-
- [42] V. Balzani, G. Bergamini, F. Marchioni e P. Ceroni, "Ru(II)-bipyridine complexes in supramolecular systems, devices and machines.," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 250, pp. 1254-1266, 2006.
- [43] J. E. Collins, J. J. S. Lamba, J. C. Love, J. E. McAlvin, C. Ng, B. P. Peters, X. Wu e C. L. Fraser, "Ruthenium(II) r-Diimine Complexes with One, Two, and Three 4,4'-Bis(hydroxymethyl)-2,2'-bipyridine and 4,4'-Bis(chloromethyl)-2,2'-bipyridine Ligands: Useful Starting Materials for Further Derivatization," *Inorg. Chem.*, vol. 38, pp. 2020-2024, 1999.
- [44] X. Zhou, D. Zhu, Y. Liao, W. Liu, H. Liu, Z. Ma e D. Xing, "Synthesis, labeling and bioanalytical applications of a tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-based electrochemiluminescence probe.," *Nat. Protoc.*, vol. 9, pp. 1146-1159, 2014.
- [45] A. Pilon, "Desenvolvimento de novos complexos de ruténio contendo ligandos poliméricos como potenciais fármacos para a terapia do melanoma.," Projeto final de curso no âmbito de Licenciatura em Química Tecnológica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2014.
- [46] O. Dechy-Cabaret, B. Martin-Vaca e D. Bourissou, "Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide.," *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 6147-6176, 2004.
- [47] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw e K. I. Goldberg, "NMR chemical shifts of srace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist.," *Organometallics*, nº 29, pp. 2176-2179, 2010.
- [48] J. U. Izunobi e C. L. Higginbotham, "Polymer Molecular Weight Analysis by ¹H-NMR Spectroscopy," *J. Chem. Educ.*, vol. 88, pp. 1098-1104, 2011.
- [49] B. P. Sullivan, D. J. Salmon e T. J. Meyer, "Mixed Phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium.," *Inorg. Chem.*, vol. 17, pp. 3334-3341, 1978.
- [50] A. S. R. F. C. Assis, *Síntese de novos complexos de iões metálicos e avaliação do seu potencial como metalofármacos. (Tese de Mestrado)*, Tese no âmbito de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2015.
- [51] G. A. Crosby, W. G. Perkins e D. M. Klassen, "Luminescence from transition-metal complexes: tris(2,2'-bipyridine) and tris(1,10-phenantroline)ruthenium(II).," *J. Chem. Phys.*, vol. 43, pp. 1498-1503, 1965.
-

-
- [52] R. A. Palmer e T. S. Piper, "2,2'-bipyridine complexes. I. Polarized crystal spectra of tris(2,2'-bipyridine)copper(II), -nickel(II), -cobalt(II), -iron(II), and -ruthenium(II).," *Inorg. Chem.*, vol. 5, pp. 864-878, 1966.
- [53] K. Yasugi, T. Nakamura, Y. Nagasaki, M. Kato e K. Kataoka, "Sugar-installed polymer micelles: synthesis and micellization of poly(ethyleneglycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain end.," *Macromolecules*, vol. 32, pp. 8024-8032, 1999.
- [54] "Pallav Chemicals & Solvent Pvt. Ltd.," [Online]. Available: http://www.pallavchemicals.com/miscibility_and_polarity_chart.html. [Acedido em 25 8 2016].
- [55] M. Homocianu, A. Airinei e D. O. Dorohoi, "Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra.," *J. Adv. Res. in Physics*, vol. 2, pp. 1-9, 2011.
- [56] A. A. Bhuiyan, S. Kudo e J. Bartlett, "Synthesis and characterization of ruthenium complexes containing chlorophenanthroline and bipyridine.," *J. Arkansas Sci.*, vol. 64, pp. 33-40, 2010.
- [57] "Solvent cut off for UV-Vis," [Online]. Available: http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/UV_Cutoff.pdf. [Acedido em 28-8-2016].
- [58] "Tables of Physical & Chemical Constants," National Physical Laboratory, [Online]. Available: http://www.kayelaby.npl.co.uk/chemistry/3_8/3_8_7.html. [Acedido em 28-8-2016].
- [59] S. E. Angell, Y. Zhang, C. W. Rogers, M. O. Wolf e W. E. Jones, "Photophysical properties of Ru(II) bipyridyl complexes containing hemilabile phosphine - ether ligands.," *Inorg. Chem.*, vol. 44, pp. 7377-7384, 2005.
- [60] Q.-X. Zhou, W.-H. Lei, Y. Sun, J.-R. Chen, C. Li, Y.-J. Hou, X.-S. Wang e B.-W. Zhang, "[Ru(bpy)_{3-n}(dpb)_n]²⁺: Unusual photophysical property and efficient DNA photocleavage activity.," *Inorg.Chem.*, vol. 49, pp. 4729-4731, 2010.
- [61] L. J. Henderson e W. R. Cherry, "Selective perturbation of ligand field excited states.," *J. Photochem.*, vol. 28, pp. 143-151, 1985.
- [62] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., cap. 1, 4, 6 e 8., Springer, 2006.
- [63] P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, 4th ed., Oxford University Press, 1990.
-

-
- [64] J.-K. Lee, D. Yoo e M. F. Rubner, "Synthesis and characterization of an electroluminescent polyester containing the Ru(II) complex.," *Chem. Mat.*, vol. 9, pp. 1710-1712, 1997.
- [65] D. J. Charboneau, N. A. Piro, W. S. Kassel, T. J. Dudley e J. J. Paul, "Reprint of: Structural, electronic and acid/base properties of $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{bpy}(\text{OH})_2)_2]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipyridine, $\text{bpy}(\text{OH})_2$ = 4,4-dihydroxy-2,2'-bipyridine).," *Polyhedron*, vol. 114, pp. 472-481, 2016.
- [66] G. Nogueira, O. Dömötör, A. Pilon, M. P. Robalo, F. Avecilla, M. H. Garcia, É. A. Enyedy e A. Valente, " η^6 -(2-Phenoxyethanol) ruthenium(II)-complexes of 2,2'-bipyridine and its derivatives: solution speciation and kinetic behaviour.," *J. Org. Chem.*, vol. 820, pp. 20-29, 2016.
- [67] D. P. Rillema, G. Allen, T. J. Meyer e D. Conrad, "Redox properties of ruthenium(II) tris chelate complexes containing the ligands 2,2'-bipyrazine, 2,2'-bipyridine, and 2,2'-bipyrimidine.," *Inorg. Chem.*, vol. 22, pp. 1617-1622, 1983.
- [68] H. Yi, J. A. Crayston e J. T. S. Irvine, *Dalton Trans.*, pp. 685-691, 2003.
- [69] B. Kommanaboyina e C. T. Rhodes, "Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage.," *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, vol. 25, pp. 857-868, 1999.
- [70] "Sigma-Aldrich," [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h3375?lang=pt®ion=PT&gclid=C NCS0Z2Cj88CFdgaGwodHw8HBw>. [Acedido em 14 9 2016].
- [71] J. A. Kellum, "Determinants of blood pH in health and disease," *Crit Care*, vol. 4, pp. 6-14, 2000.
- [72] N. C. Santos, J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva e C. Saldanha, "Multidisciplinary utilization of fimethyl sulfoxide: pharmacological. Cellular, and molecular aspects.," *Biochem. Pharm.*, vol. 65, pp. 1035-1041, 2003.
- [73] J. P. Paris e W. W. Brandt, "Charge transfer luminescence of a ruthenium(II) chelate.," *J. Am. Chem. Soc.*, p. 5001, 1959.
- [74] C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson e B. K. Keppler, "KP1019, a new redox-active anticancer agent –
-

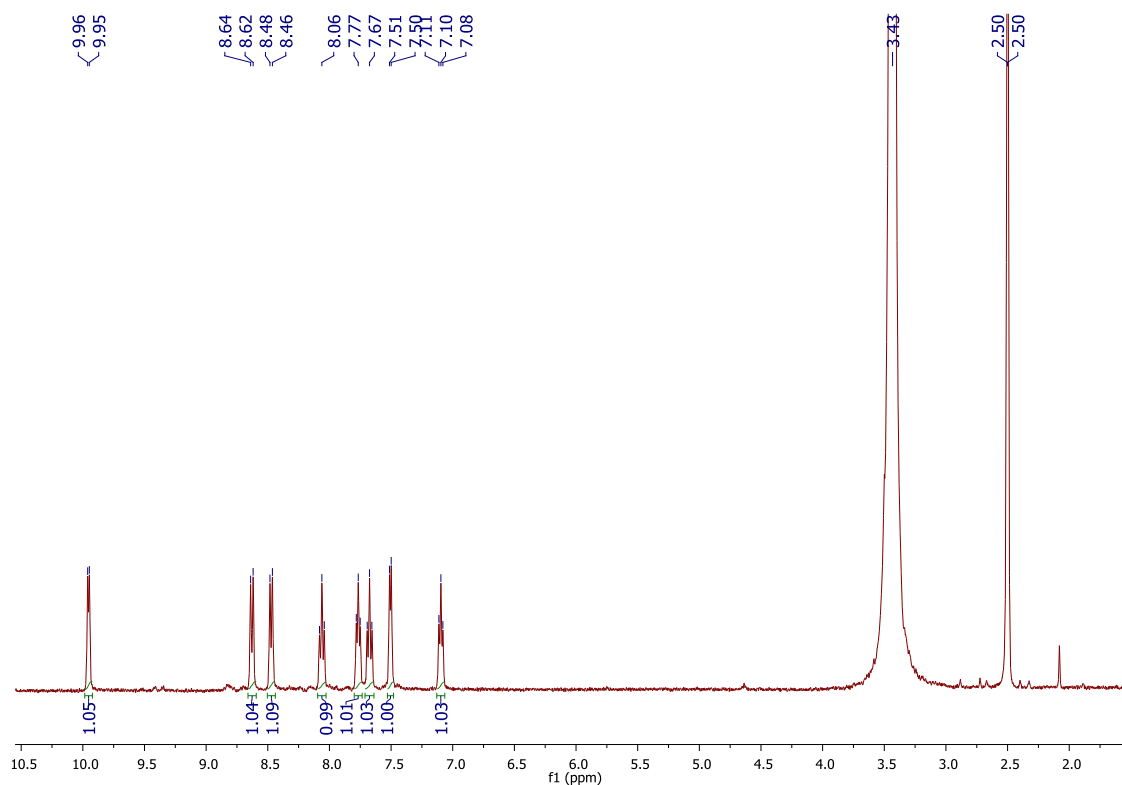
Preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients.,” *Chem. Biodivers.*, pp. 2140-2155, 2008.

- [75] P. Som, Z. H. Oster, K. Matsui, G. Guglielmi, B. R. R. Persson, M. L. Pellettieri, S. C. Srivastava, P. Richards, H. L. Atkins e A. B. Brill, “Ru-97-transferrin uptake in tumor and abscess.,” *Eur. J. Nucl. Med.*, pp. 491-494, 1983.
- [76] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun e K. Ho, “Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway.,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, pp. 561-587, 2002.
- [77] B. Meloun, L. Morávek e V. Kostka, “Complete amino acid sequence of human serum albumin.,” *Febs Letters*, vol. 58, pp. 134-137, 1975.
- [78] A. M. Martínez, *Transport in the blood of an anti-tumor water-soluble ruthenium cyclopentadienyl complex: a Fluorescence study on albumin binding. (Tese de Mestrado)*, Tese no âmbito de Mestrado em Qualidade em Análises, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, 2014.
- [79] G. Sudlow, D. J. Birkett e D. N. Wade, “The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 11, pp. 824-832, 1975.
- [80] “CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Technical bulletin.,” [Online]. Available: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>. [Acedido em 12-11-2016].
- [81] S. A. O'Toole, B. L. Sheppard, DPhil, E. P. J. McGuinness, N. C. Gleeson, M. Yoneda e J. Bonnar, “The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours.,” *Cancer Detect. Prev.*, vol. 27, pp. 47-54, 2003.
- [82] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw e K. I. Goldberg, “NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist.,” *Organometallics*, vol. 29, pp. 2176-2179, 2010.
- [83] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.*, Wiley-VCH, 2001.
- [84] A. F. Sousa, “O papel da membrana celular na terapia do cancro com novos compostos de Ruténio. (Tese de Mestrado),” Tese no âmbito de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2015.

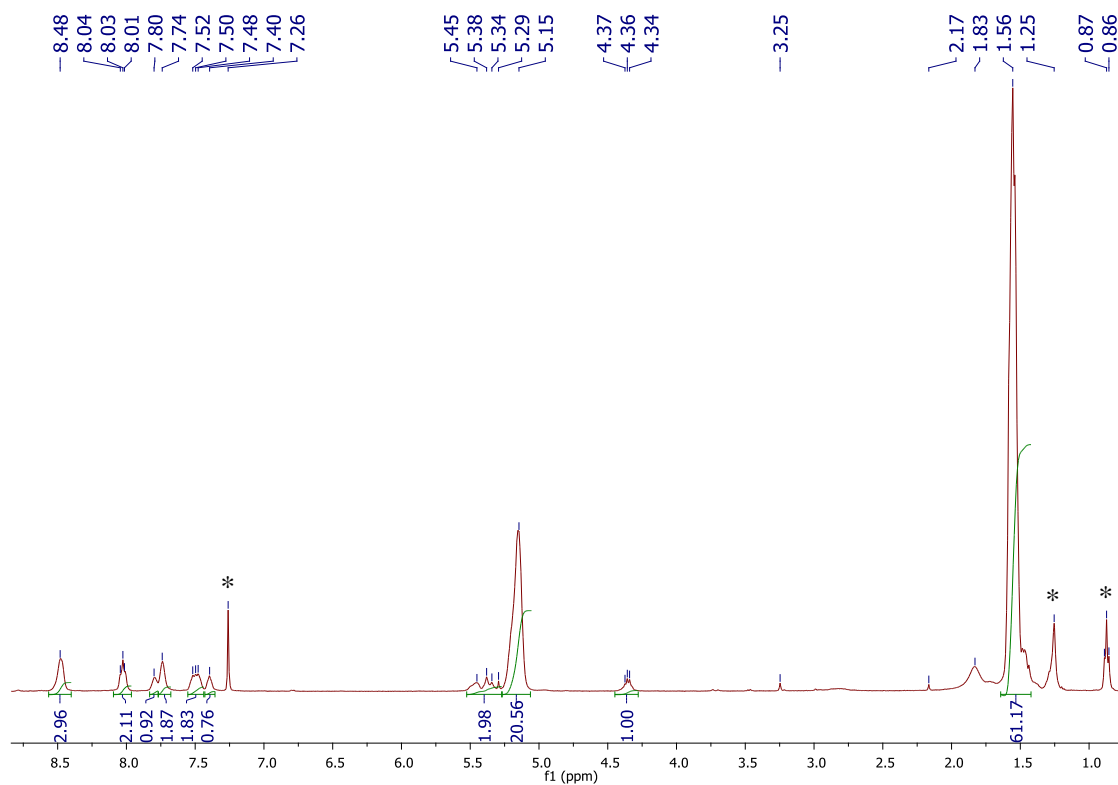
-
- [85] A. Coutinho e M. Pietro, "Ribonuclease T1 and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide.," *J. Chem. Edu.*, vol. 70, pp. 425-428, 1993.
- [86] N. G. Connelly e W. E. Geiger, "Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry.," *Chem. Rev.*, vol. 96, pp. 877-910, 1996.
- [87] W.-P. To, T. Zou, R. W.-Y. Sun e C.-M. Che, "Light-induced catalytic and cytotoxic properties of phosphorescent transition metal compounds with a d8 electronic configuration.," *Phil Trans R Soc A*, vol. 371, p. 20120126, 2013.
- [88] "Alibaba.com," [Online]. Available: https://www.alibaba.com/product-detail/Dean-and-stark-apparatus_674166521.html. [Acedido em 23-8-2016].
- [89] X. Wu e C. L. Fraser, "The importance of macroligand molecular weight and solvent polarity in modulating metal core reactivity in heteroleptic polymeric ruthenium tris(bipyridine) complex synthesis.," *Macromolecules*, vol. 33, pp. 7776-7785, 2000.
- [90] T. S. Morais, A. Valente, A. I. Tomaz, F. Marques e M. H. Garcia, "Tracking anti-tumor metallodrugs: promising agents with the Ru(II)- and Fe(II)-cyclopentadienyl scaffolds.," *Fut. Med. Chem.*, vol. 8, pp. 527-544, 2016.
- [91] A. Vogler e H. Kunkely, "Ligand-to-ligand and intraligand charge transfer and their relation to charge transfer interactions in organic zwitterions.," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 251, pp. 577-583, 2007.
- [92] W.-P. To, T. Zou, R. W.-Y. Sun e C.-M. Che, "Light-induced catalytic and cytotoxic properties of phosphorescent transition metal compounds with a d8 electronic configuration.," *Phil. Trans. R. Soc. A.*, vol. 371, p. 20120126, 2013.
- [93] R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger e B. K. Keppler, "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application.," *Chem. Sci.*, vol. 5, pp. 2925-2932, 2014.
- [94] L. Côrte-Real, F. Mendes, J. Coimbra, T. S. Morais, I. A. Tomaz, A. Valente, M. H. Garcia, I. Santos, M. Bicho e F. Marques, "Anticancer activity of structurally related ruthenium(II) cyclopentadienyl complexes.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 6, pp. 853-867, 2014.
- [95] D. M. Rayner e A. G. Szabo, "Time resolved fluorescence of aqueous tryptophan.," *Can. J. Chem.*, vol. 56, pp. 743-745, 1978.
-

-
- [96] Y.-J. Liu, C.-H. Zeng, H.-L. Huang, L.-X. He e F.-H. Wu, "Synthesis, DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity and antioxidant activity of ruthenium (II) polypyridyl complexes.," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 564-571, 2010.
- [97] L. Spiccia, G. B. Deacon e C. M. Kepert, "Synthetic routes to homoleptic and heteroleptic ruthenium(II) complexes incorporating bidentate imine ligands.," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 248, pp. 1329-1341, 2004.

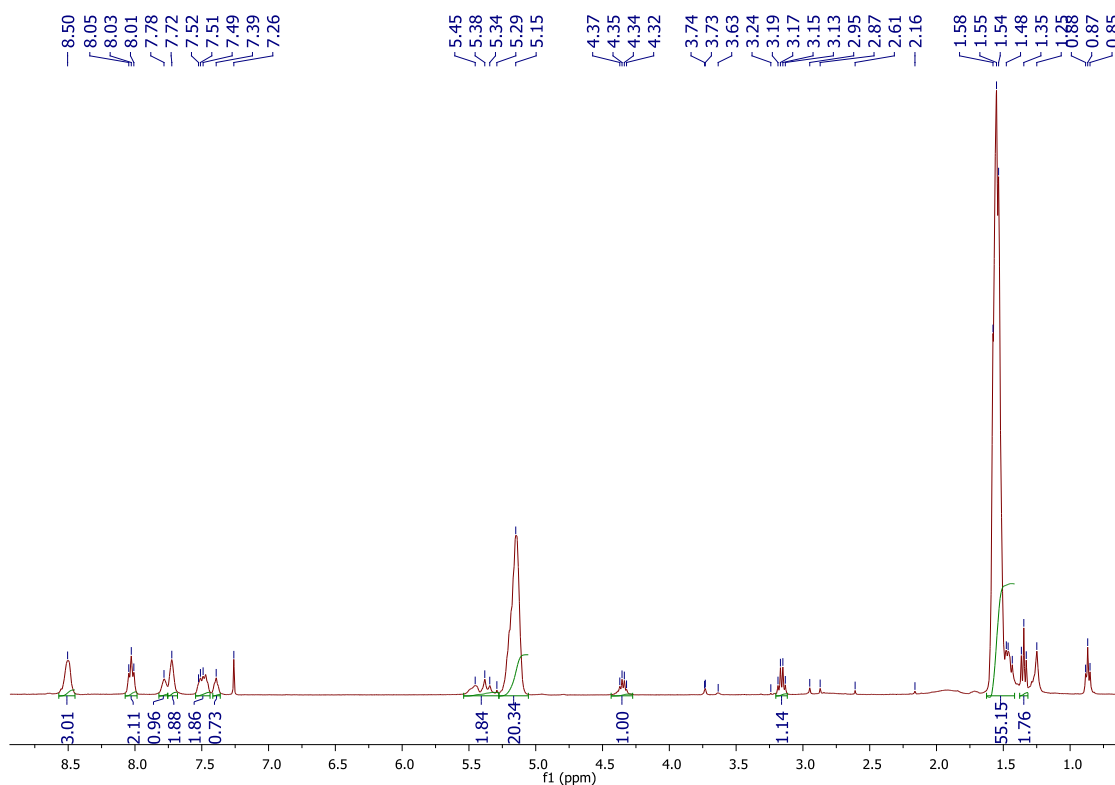
Anexos



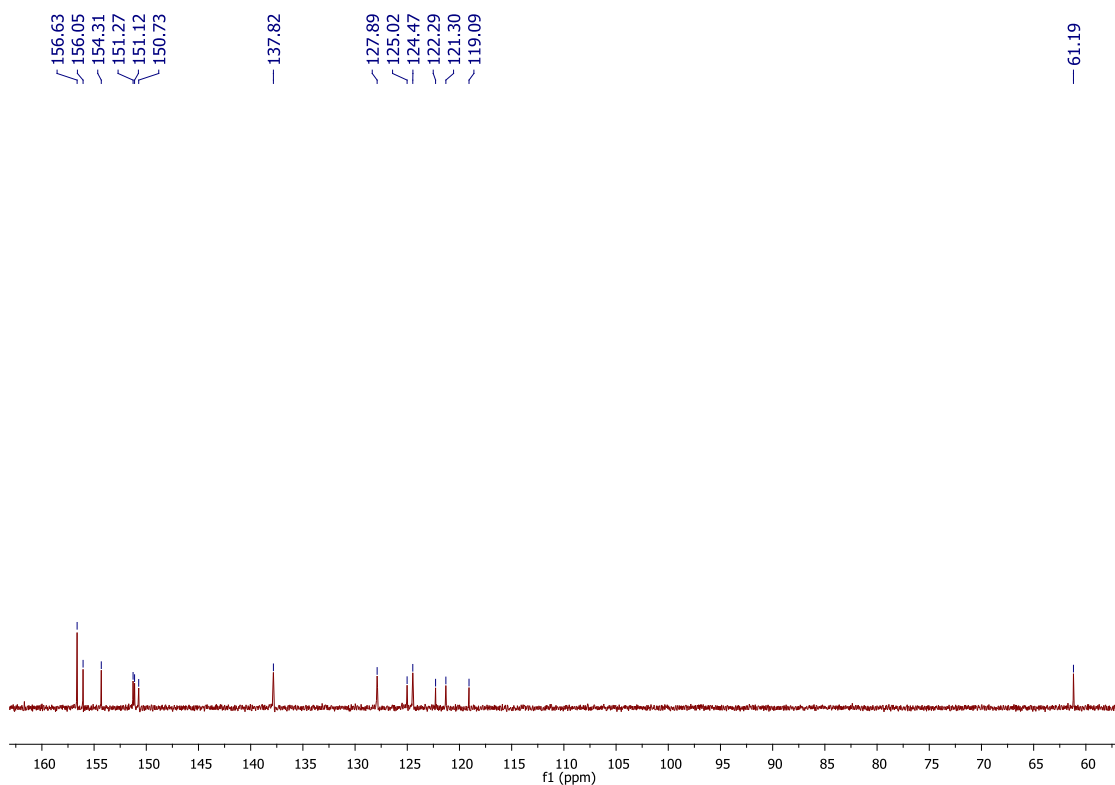
Anexo 1: Espectro de ^1H -RMN do precursor $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$, em DMSO-d_6 .



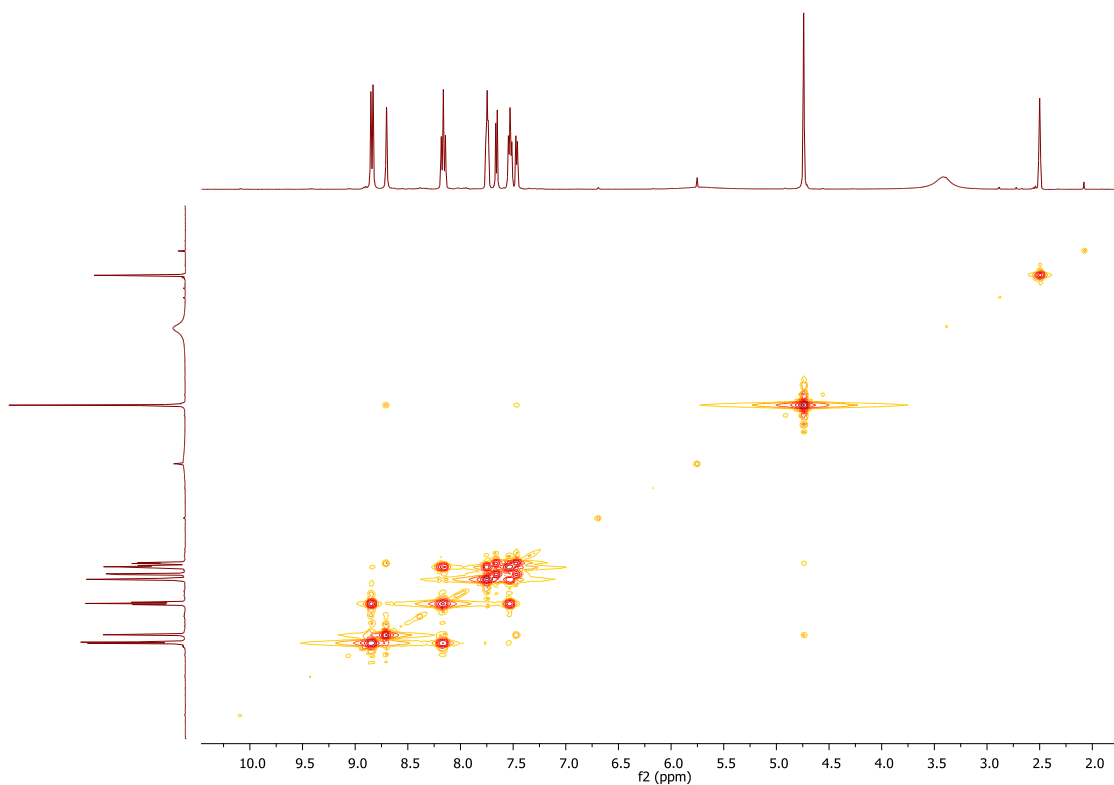
Anexo 2: Espectro de ^1H -RMN do Complexo F01, em clorofórmio-d. Os sinais assinalados com * foram atribuídos a solventes: 7,26 ppm corresponde ao CDCl_3 ; 1,25 e 0,67 ppm correspondem a n-hexano. [47]



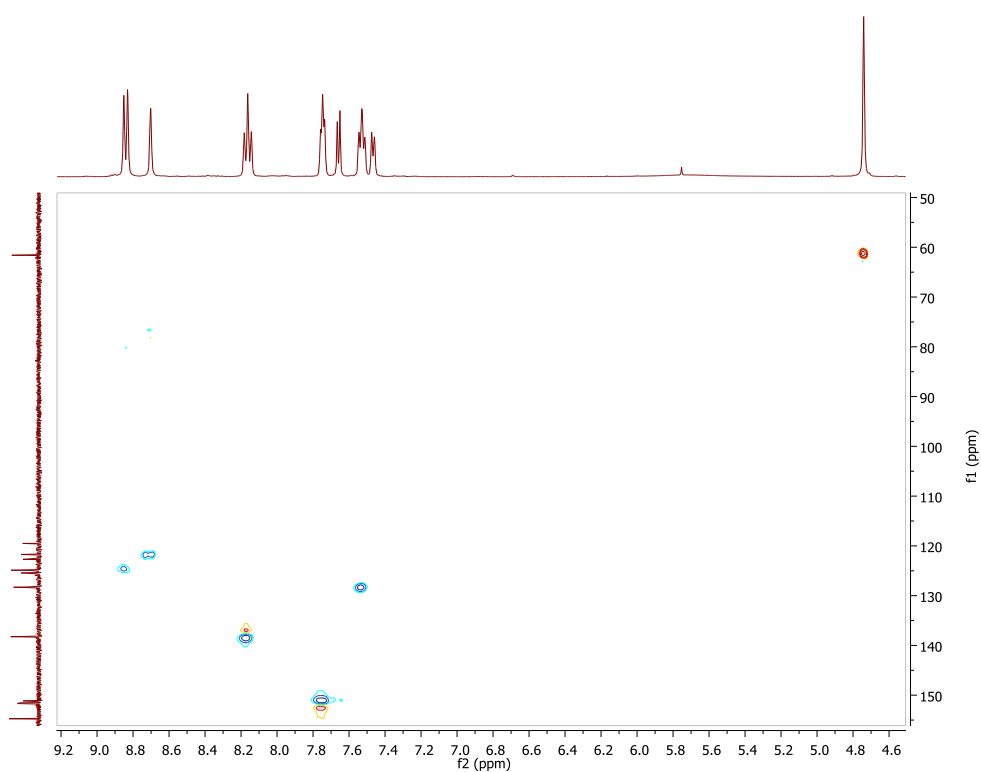
Anexo 3: Espetro de ^1H -RMN do complexo F02 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-PLA-Gluc})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em clorofórmio-d.



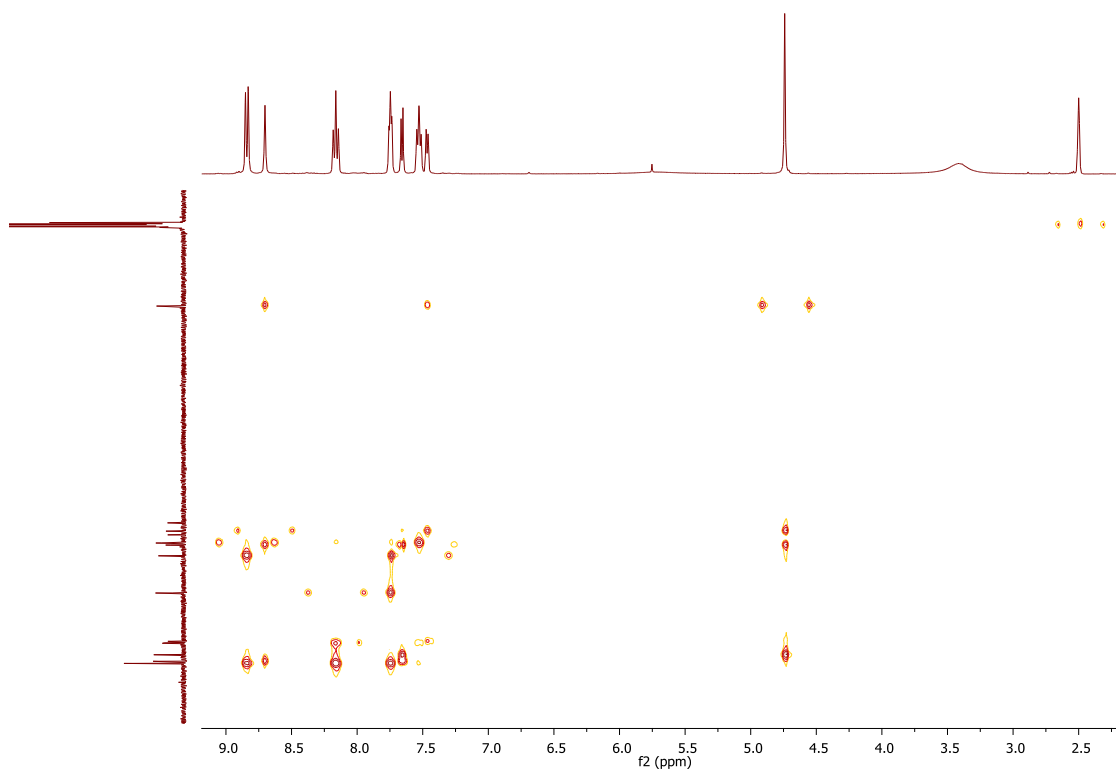
Anexo 4: Espetro de ^{13}C -RMN do complexo F03 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{MeOH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em DMSO- d_6 .



Anexo 5: Espectro 2D COSY do complexo F03 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{MeOH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em DMSO-d_6 .

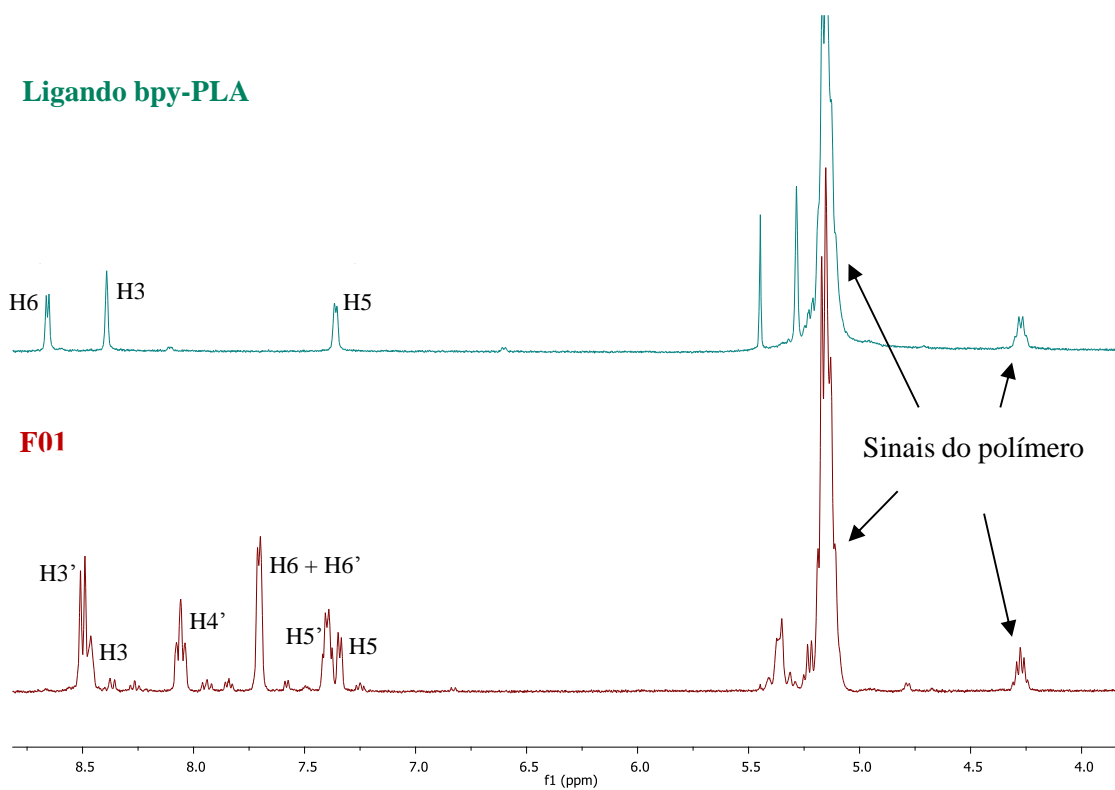


Anexo 6: Espectro 2D HSQC do complexo F03 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{MeOH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em DMSO-d_6 .

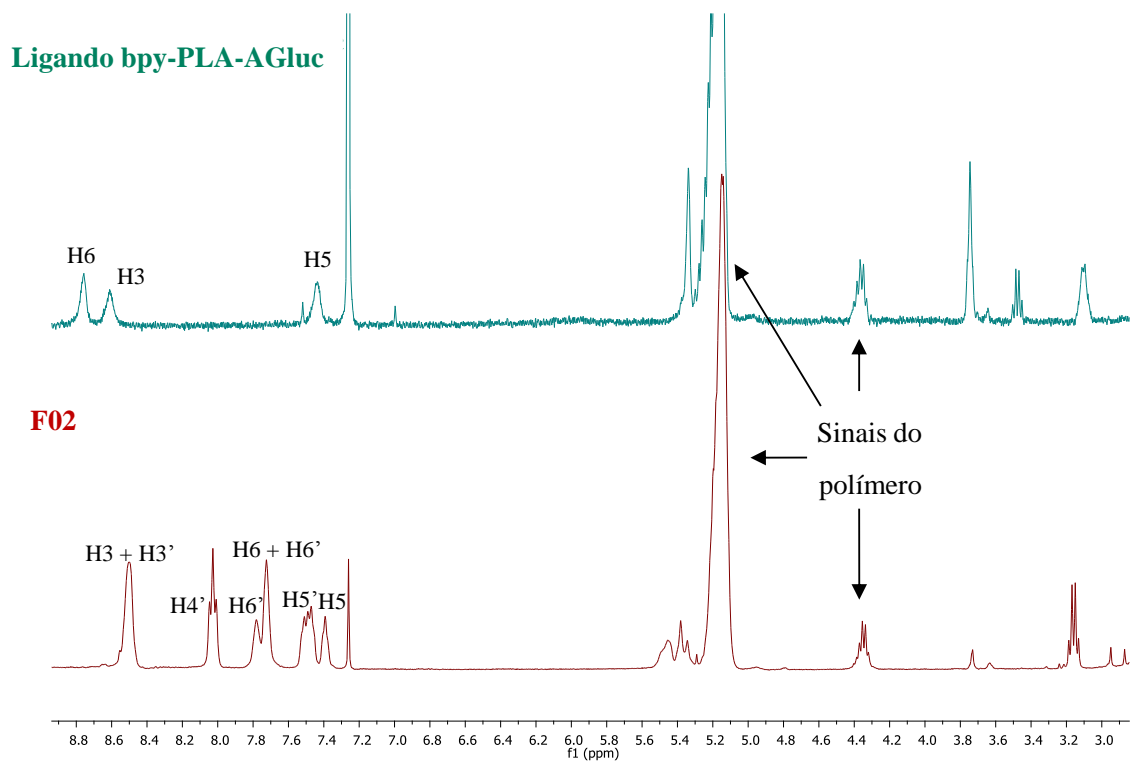


Anexo 7: Espectro 2D HMBC do complexo F03 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\{\text{bpy}(\text{MeOH})_2\}][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, em DMSO-d_6 .

Ligando bpy-PLA



Anexo 8: Sobreposição dos espectros de ^1H -RMN dos complexos F01 e do seu ligando bpy-PLA, em acetonitrilo- d_3 .



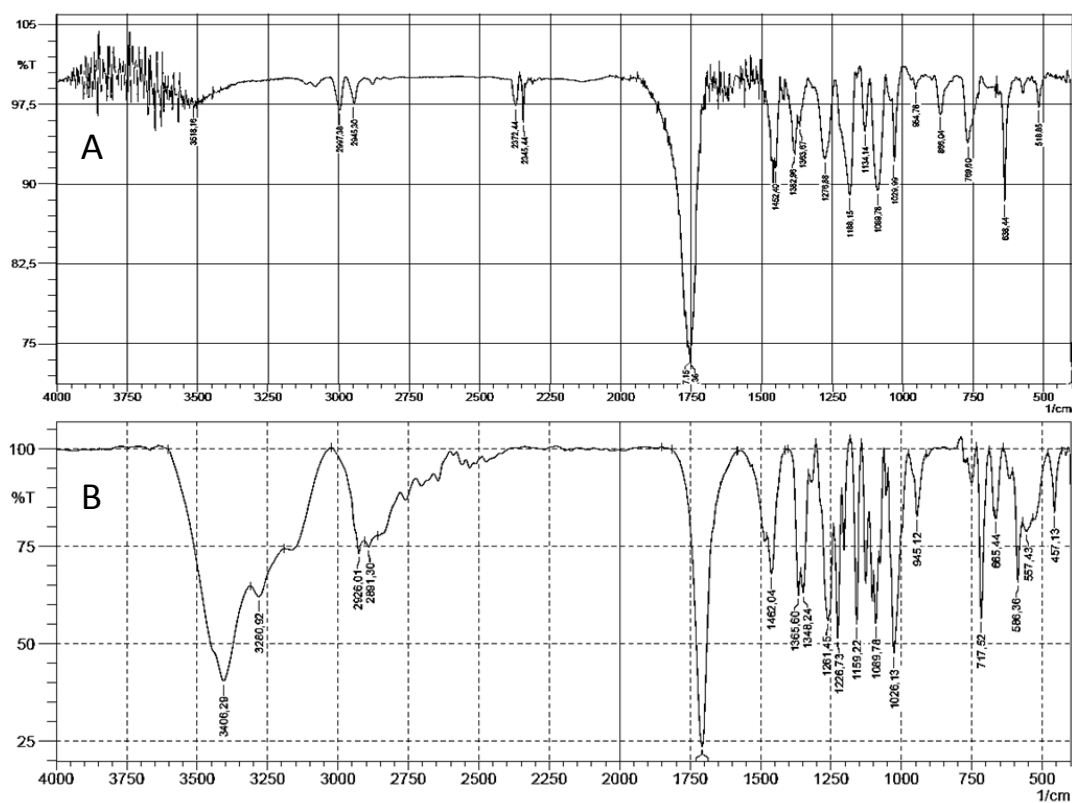
Anexo 9: Sobreposição dos espectros de ^1H -RMN dos complexos F02 e do ligando bpy-PLA-Gluc, em clorofórmio-d..

Anexo 10: Valores de c.d.o. máximo das bandas e ombros (sh), e respectiva absorptividade molar obtido do espectro de absorção UV-Vis para todos os complexos, em diferentes solventes e misturas de solventes, à temperatura ambiente (25 ± 3 °C).

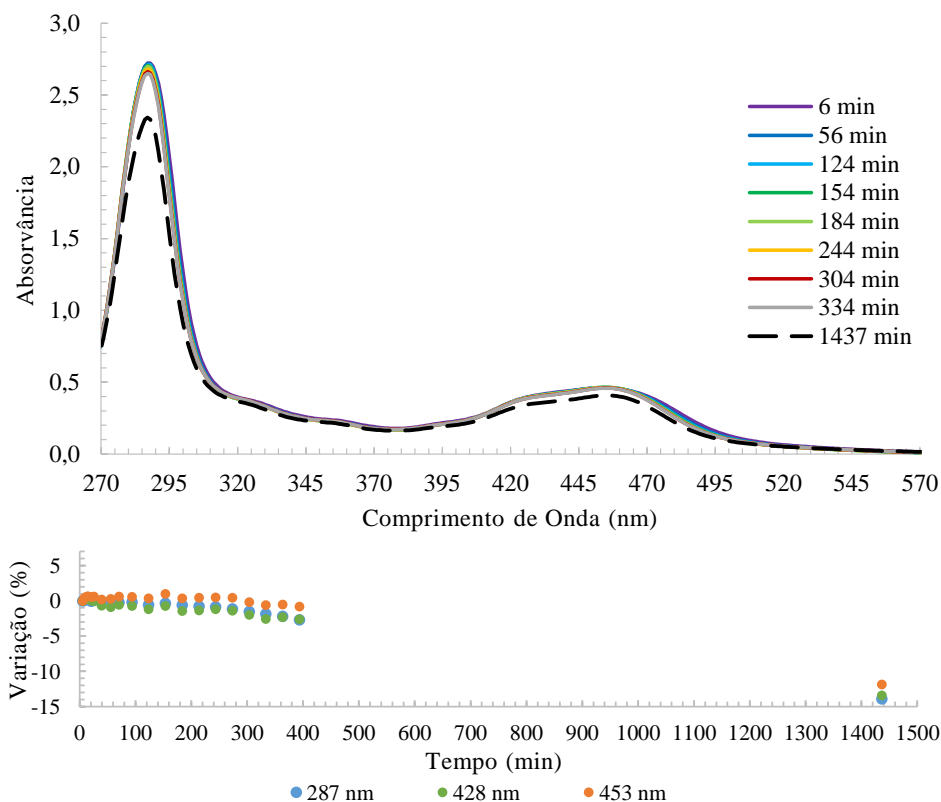
	Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)							
DCM	F01	456,0 13900,0	434 (sh)	394 (sh)	360 (sh)	326 (sh)	290,0 83200,0	255 (sh)	247,0 27500,0
	F02	456,0 9840,0	434 (sh)	394 (sh)	360 (sh)	326 (sh)	289,0 57200,0	255 (sh)	247,0 17200,0
	F03	457,0 11564,1	430 (sh)	395 (sh)	360 (sh)	327 (sh)	289,0 69202,1	256 (sh)	246,0 21635,8
DMSO	F01	457,0 11876,8	434 (sh)	394 (sh)	360 (sh)	330 (sh)	292,0 71800,0		
	F02	457,0 15900,0	434 (sh)	394 (sh)	360 (sh)	330 (sh)	292,0 78400,0		
	F03	457,0 23529,5	430 (sh)	400 (sh)	363 (sh)	330 (sh)	291,0 129343,7		
DMSO 2% e DMEM	F01	451,0 7013,7	430 (sh)	398 (sh)	356 (sh)	319 (sh)	290,0 34922,3		
	F02	454,0 2751,9	425 (sh)	394 (sh)	354 (sh)	326 (sh)	289,0 19104,9		
	F03	456,0 11495,8	428 (sh)	395 (sh)	355 (sh)	325 (sh)	293,0 43398,2		
DMSO 2% e HEPES	F01	454,0 8990,0	428 (sh)	398 (sh)	356 (sh)	330 (sh)	288,0 55200,0		
	F02	453,0 9830,0	428 (sh)	398 (sh)	356 (sh)	324 (sh)	287,0 58100,0		
	F03	455,0 12977,1	428 (sh)	395 (sh)	360 (sh)	325 (sh)	287,0 75601,4		

Anexo 11: Identificação e atribuição das bandas mais importantes de FTIR dos compostos F01, F02 e F03.

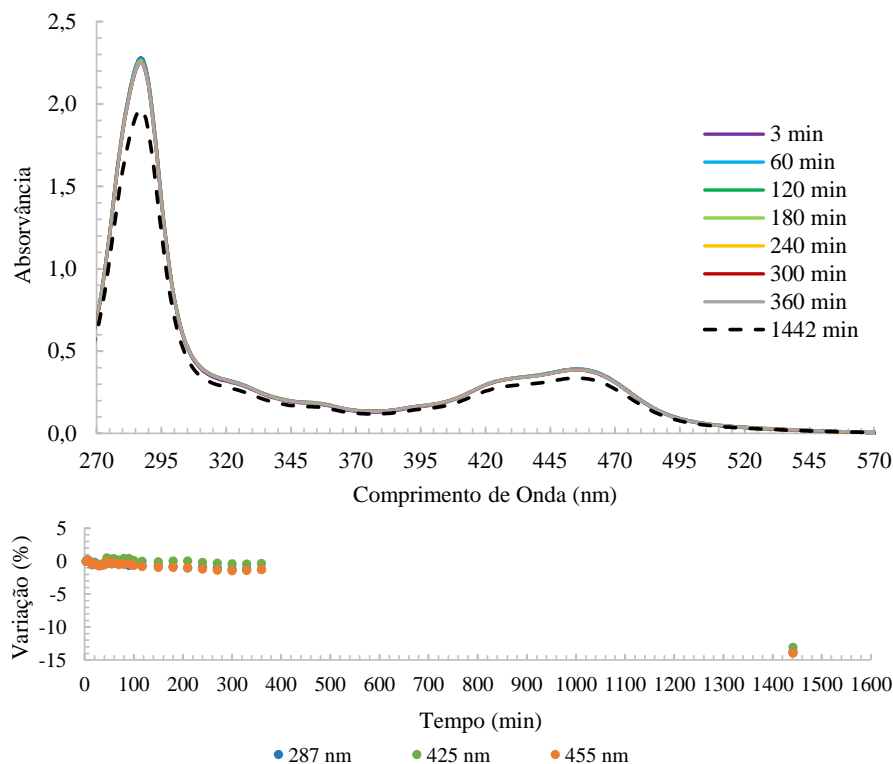
Complexo	Banda (número de onda /cm ⁻¹)	Atribuição
F01	768	δ (C-H) em aromáticos, ou em CH ₂ de alcanos
	1273	ν (C-N), aminas aromáticas; contra-íão CF ₃ SO ₃ ⁻
	1381	δ (C-H), CH ₃ em alcanos
	1460	δ (C-H), alcanos (CH ₂)
	1630	δ (C=C), aromáticos
	1753	ν (C=O), éster polímero
	2945	ν (C-H), alcanos
	2997	ν (C-H), alcanos e/ou aromáticos
F02	770	δ (C-H) em aromáticos, ou em CH ₂ de alcanos
	1275	ν (C-N), aminas aromáticas; contra-íão CF ₃ SO ₃ ⁻
	1379	δ (C-H), CH ₃ em alcanos
	1452	δ (C-H), alcanos (CH ₂)
	1755	ν (C=O), éster polímero
	2945	ν (C-H), alcanos
	2997	ν (C-H), alcanos e/ou aromáticos
F03	770	δ (C-H) em aromáticos, ou em CH ₂ de alcanos
	1281	ν (C-N), aminas aromáticas; Contra-íão CF ₃ SO ₃ ⁻
	1445	δ (C-H), alcanos (CH ₂)
	1609	δ (C=C), aromáticos
Gluc	1090	ν (C-O-C) éter cíclico
	1707	ν (C=O), ácido carboxílico
	3600-2500	ν (O-H), ácido carboxílico



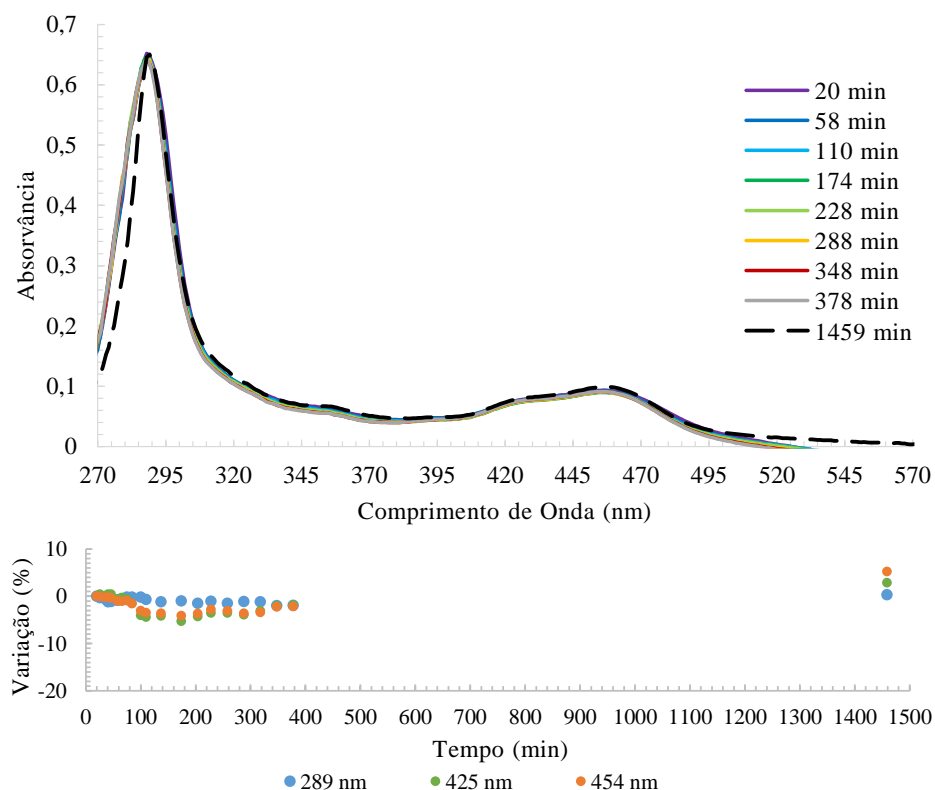
Anexo 12: A) Espectro de FTIR do complexo F02, Ru(bpy)₂(bpy-PLA-Gluc)]. B) Espectro de FTIR do ácido *D*-glucurônico.



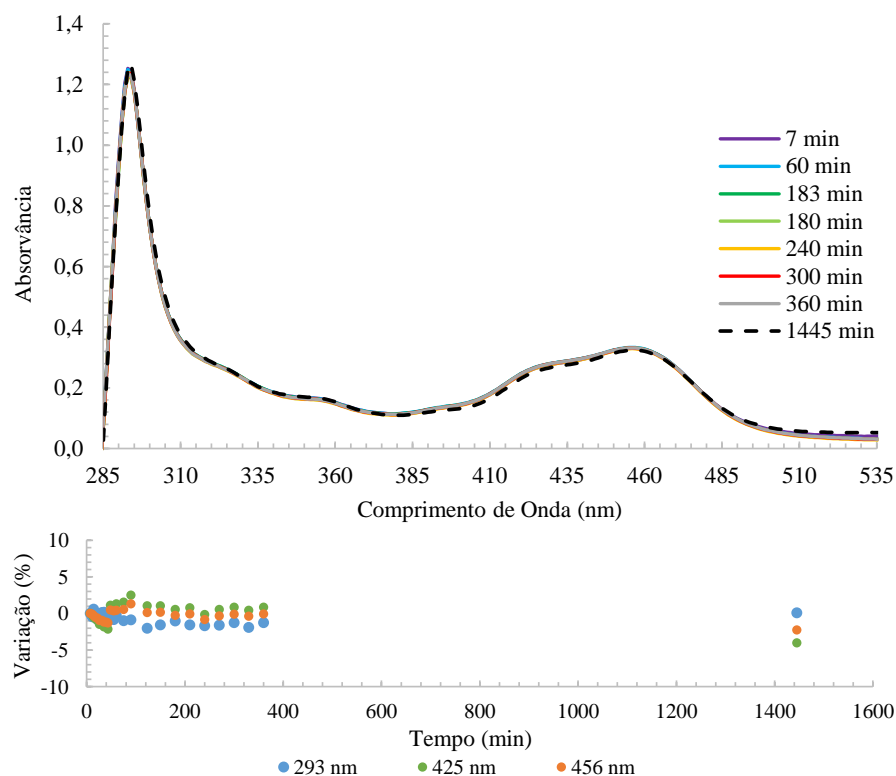
Anexo 13: Estabilidade do complexo F02 em DMSO(1%)/HEPES a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $38,7 \mu\text{M}$ ao longo de 24 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 6$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 6 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 88,1% ao fim das 24 horas.



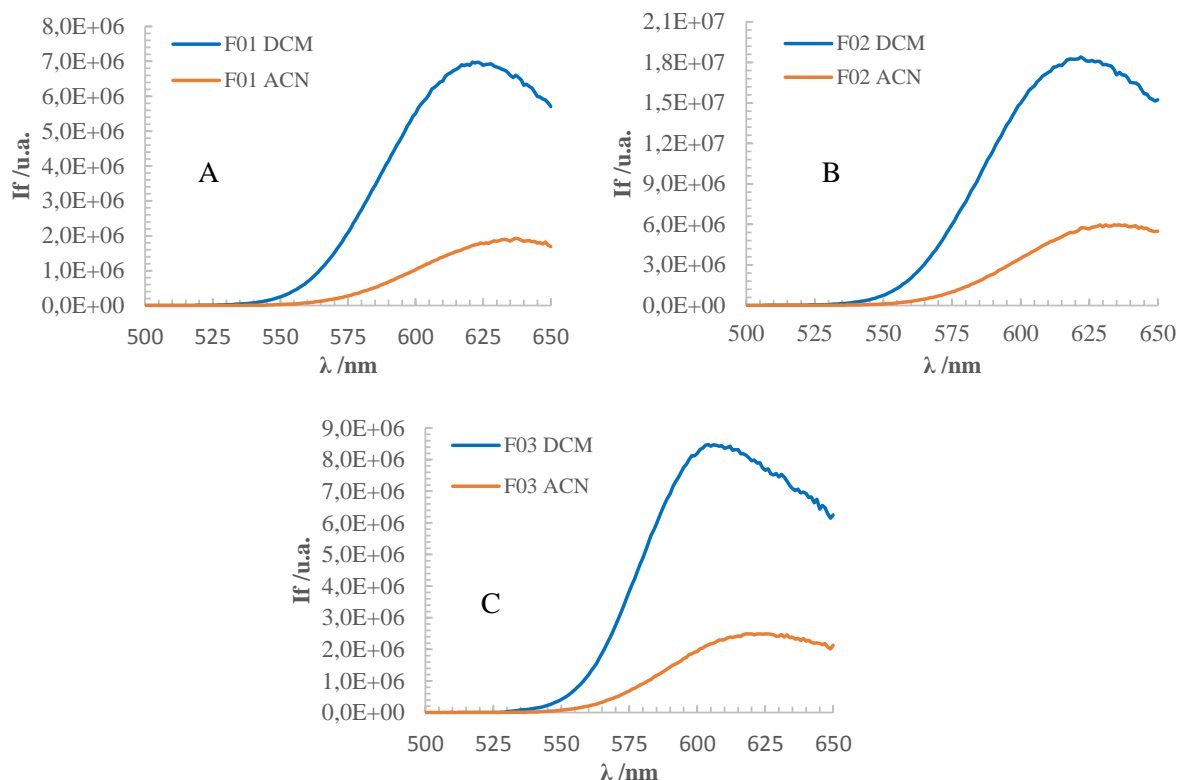
Anexo 14: Estabilidade do complexo F03 em DMSO(2%)/HEPES a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $30,2 \mu\text{M}$ ao longo de 24 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 3$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 3 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 86,0% ao fim das 24 horas.



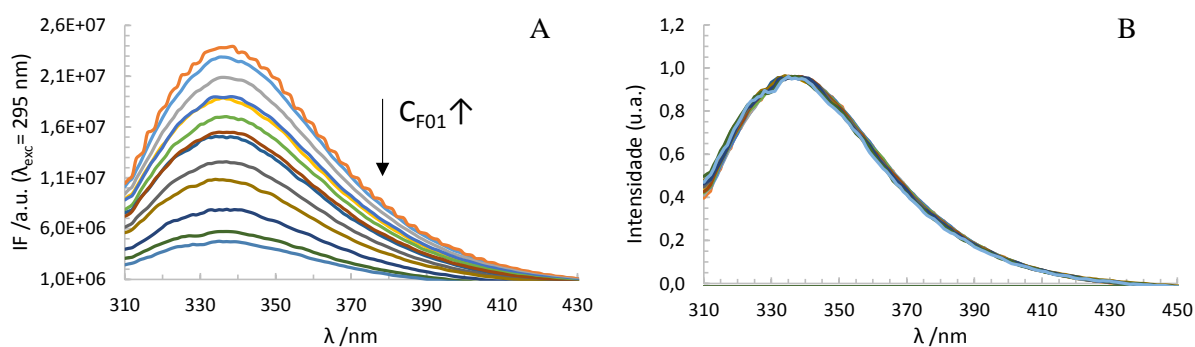
Anexo 15: Estabilidade do complexo F02 em DMSO(5%)/DMEM a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $33,9 \mu\text{M}$ ao longo de 24,3 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 20$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 20 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 92,6% ao fim das 24 horas.



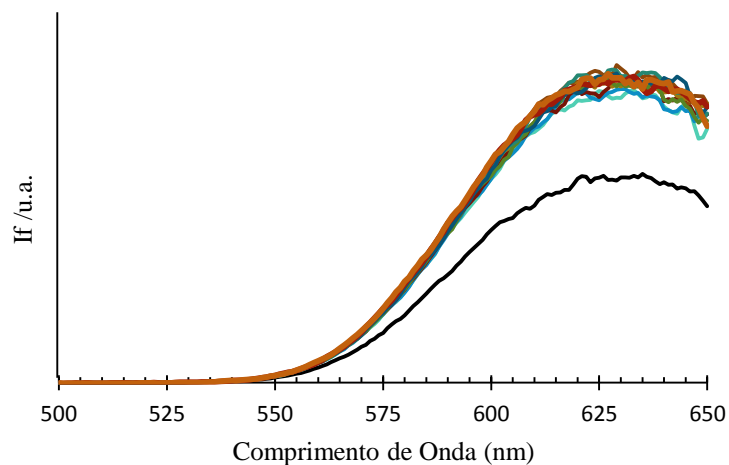
Anexo 16: Estabilidade do complexo F03 em DMSO(2%)/DMEM a 25 ± 3 °C: *cima* - Evolução do espectro de UV-Vis obtido para uma solução de complexo de concentração $28,9 \mu\text{M}$ ao longo de 24 horas; *baixo* - Variação (em %) da intensidade do espectro aos valores de comprimento de onda indicados. ($t_0 = 7$ min, t_{mix} refere-se ao momento em que o complexo foi dissolvido em DMSO, 7 minutos antes de t_0 .) O complexo mantém a sua integridade até uma extensão de 97,7% ao fim das 24 horas.



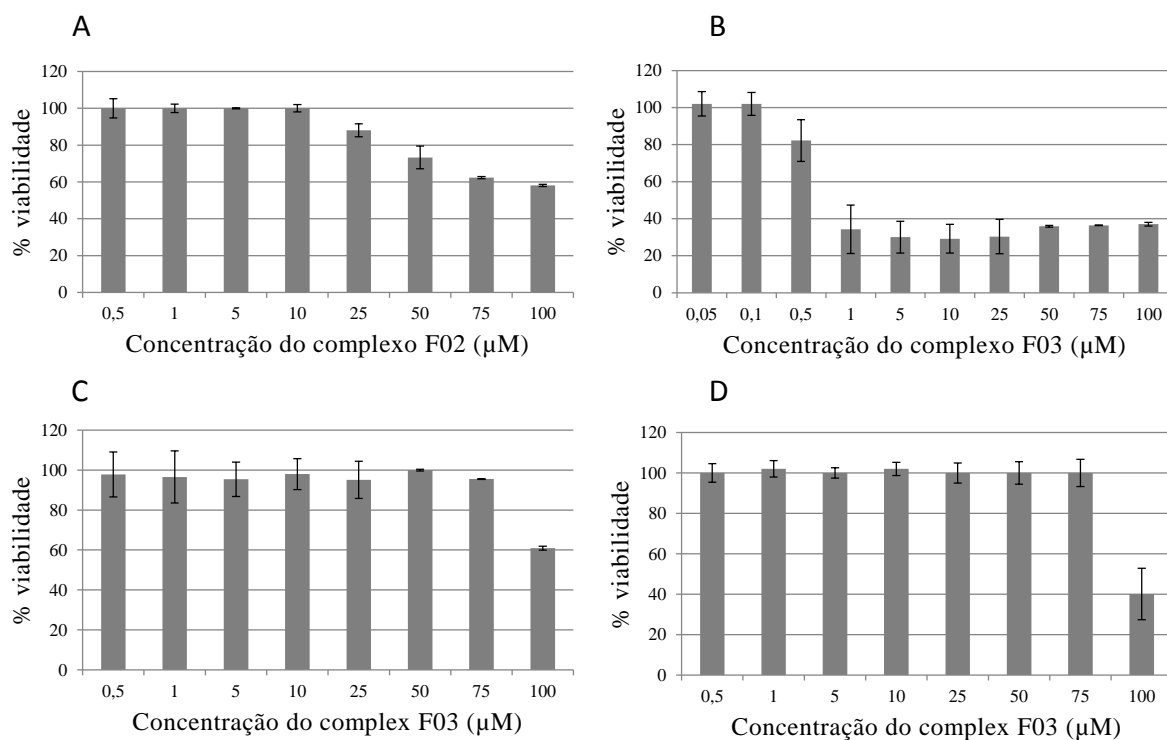
Anexo 17: Espectros de emissão dos complexos F01, F02 e F03 em diclorometano (DCM) e acetonitrilo (ACN), onde $\lambda_{exc} = 455$ nm (460 nm para F03/DCM), e $T = 25 \pm 0,1$ °C. As concentrações são: A) 2,5 μ M (DCM); 4,0 μ M (ACN); B) 5,0 μ M (DCM e ACN). C) 10,0 μ M (DCM); 5,0 μ M (ACN).



Anexo 18: Espectros obtidos por espectroscopia de emissão de soluções contendo HSA ($C_{HSA} = 4,58$ μ M; $\lambda_{exc} = 295$ nm) e o complexo F01 (concentração crescente) em DMSO(2%)/HEPES a $25 \pm 0,1$ °C. A) Evolução da intensidade de emissão com o aumento da concentração do complexo. A primeira solução (linha laranja) contém apenas HSA. B) Espectros normalizados (ao comprimento de onda máximo).



Anexo 19: Espectros de emissão do complexo F01 (4,88 μM) na ausência (preto) e na presença (cores) de concentrações crescentes de albumina sérica humana (HSA) em DMSO(2%)/HEPES, a $25 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$.



Anexo 20: Gráficos de viabilidade celular ($t_{\text{incubação}} = 48$ horas): A) Complexo F02 na linha A2780 (adenocarcinoma do ovário humano, sensível à cisplatina); B) Complexo F03 na linha A2780; C) Complexo F03 na linha MCF7 (adenocarcinoma da mama humano); D) Complexo F03 na linha Fibroblastos (células não-tumorigênicas).